
**DIE ROLLE DER ARGONAUT PROTEINE
IN DER ENTSTEHUNG UND PROGRESSION
DES MALIGNEN MELANOMS**

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON

DANIEL REINHOLD VÖLLER

GEBOREN IN FULDA



REGENSBURG 2014

DAS PROMOTIONSGESUCH WURDE EINGEREICHT AM: 24.06.2014

DIE ARBEIT WURDE ANGELEITET VON: PROF. DR. ANJA-KATRIN BOßERHOFF

MITGLIEDER DER PROMOTIONSKOMMISSION

VORSITZENDER: PROF. DR. THOMAS DRESSSELHAUS

1. GUTACHTER: PROF. DR. ANJA-KATRIN BOßERHOFF

2. GUTACHTER: PROF. DR. GUNTER MEISTER

3. PRÜFER: PD DR. JOACHIM GRIESENBECK

TAG DES PROMOTIONSKOLLOQUIUMS: 06.02.2015

ZUSAMMENFASSUNG

Das maligne Melanom ist eine bösartige Krebserkrankung der pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten. Die Krankheit ist nahezu immer heilbar wenn der Primärtumor frühzeitig erkannt und vollständig entfernt wird. Das rasche Erkennen des Tumors ist wichtig, da das Melanom bereits in einem frühen Stadium zur Metastasierung neigt. Eine derzeit zugelassene Behandlungsmethode für Patienten mit einem metastasierenden Melanom in Kombination mit einer aktivierenden BRAF Mutation stellt der selektive Inhibitor Vemurafenib dar. Dieser inhibiert das aktivierte Onkogen BRAF^(V600E), welches in ca. 50 % aller Melanom-Patienten vorhanden ist und führt dadurch die Tumorzelle in Seneszenz. Allerdings entwickeln Melanom-Patienten mit zunehmender Behandlungsdauer Resistenzen gegen Vemurafenib. Diese Resistenzen und die Eigenschaft des Melanoms, eine hohe Toleranz gegenüber klassischen Chemo- oder Strahlentherapien zu besitzen, unterstreichen die Notwendigkeit für alternative Behandlungsmethoden für Melanom-Patienten.

MikroRNAs (miRNAs) könnten einen Angriffspunkt für eine solche Behandlungsmethode darstellen, da sie durch die Regulation der Proteinexpression viele wichtige Funktionen, wie beispielsweise die Proliferation, die Differenzierung und den Metabolismus einer Zelle, steuern. MiRNAs werden transkribiert und anschließend über eine Enzymkaskade bis zur muren miRNA prozessiert. Eine Proteinfamilie nimmt dabei eine Schlüsselfunktion ein: die Familie der Argonaut (AGO) Proteine. Diese Proteine binden die Duplex aus der muren miRNA und der zu inhibierenden *messenger* RNA (mRNA) des miRNA-Zielgens. Im Menschen gehören vier verschiedene AGO Proteine (AGO1-4) dieser Proteinfamilie an. Jedoch ist nur AGO2 in der Lage, die mRNA direkt hydrolytisch zu spalten. Die AGO Proteine 1, 3 und 4 können ebenfalls die Translation des Zielproteins inhibieren, jedoch nicht durch eine direkte Degradation des Gentranskripts.

Im ersten Abschnitt dieser Dissertation konnte erstmalig eine deutliche Reduktion aller AGO Proteine im Melanom im Vergleich zu Melanozyten nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass das AGO2 Protein stärker reprimiert wird als die übrigen AGO Proteine. Es konnte zudem festgestellt werden, dass es sich bei der AGO2 Reduktion um ein für das Melanom spezifisches Phänomen handelt, da in anderen Tumorarten keine differenzielle AGO2 Expression nachgewiesen werden konnte.

Resultierend aus den primären Ergebnissen, der melanomspezifischen AGO2 Reduktion, beschäftigte sich der zweite Teil dieser Arbeit mit den Konsequenzen dieses Phänomens für die miRNA Prozessierung und deren Einfluss auf die Zelle. Dabei zeigte sich, dass die AGO2 Reduktion für eine erhebliche Verminderung der si- und miRNA Effektivität verantwortlich ist. Mit Hilfe von cDNA-Array Analysen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die AGO2 Modulation im Melanom eine sehr große Anzahl an Proteinen beeinflusst, die in vielen wichtigen Zellprozessen involviert sind. Zudem

konnte auch eine phänotypische Veränderung in der Migrationsfähigkeit von Melanomzellen aufgrund der AGO2 Reduktion festgestellt werden.

Der dritte Teil spiegelt die Suche nach der Ursache der AGO2 Reduktion wieder. Die Änderung der AGO2 Proteinmenge ist nur durch direkte Proteinanalysen zu detektieren, nicht jedoch durch Analysen der Genexpression, was auf einen post-transkriptionellen Regulationsmechanismus hindeutet. Nach dem experimentellen Ausschluss des Proteasom-Systems als AGO2-modulierendes System in Melanomzellen konnte der Nachweis einer AGO2 Reduktion durch miRNAs erbracht werden.

Seit ihrer Entdeckung 1993 ist der Erkenntnisstand über miRNAs und deren vielseitiges Regulationsnetzwerk in der Zelle erheblich gewachsen. Seitdem sind miRNAs gewiss auch für einen Einsatz in der Therapie von Krankheiten von großem Interesse. Beispielsweise wird bei der *miRNA Replacement Therapie* eine *tumor-suppressor*-miRNA, welche einen Funktionsverlust in der Krebszelle aufweist, durch eine therapeutische miRNA ersetzt. Dieser Therapieansatz ist jedoch vollständig abhängig von einer funktionellen miRNA Prozessierung und somit auch von den AGO Proteinen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse über die spezifische AGO2 Reduktion im Melanom können daher dazu beitragen die Effektivität der *miRNA Replacement Therapie* für das maligne Melanom zu steigern.

SUMMARY

Malignant melanoma is a malignant cancer of the pigment forming cells of the skin, the melanocytes. Based on the melanoma trait of metastasizing at very early tumor stages, the complete surgical removal of the primary tumor before metastasis occurs is the only effective treatment today. An approved treatment for metastatic melanoma in combination with an activating BRAF mutation is the selective BRAF^(V600E) inhibitor Vemurafenib. This BRAF mutation is present in 50 % of all melanomas. During the therapy all melanoma patients develop resistance against Vemurafenib. This fact in combination with the high tolerance of melanoma cells against chemo- and radiotherapies highlights the necessity of new treatment modalities for melanoma patients.

MicroRNAs (miRNAs) could potentially represent a target for melanoma treatment because of their ability to modulate protein expression and therefore control processes as diverse as proliferation, differentiation and metabolism of the cell. MiRNAs are processed by a multi enzyme cascade after transcription to become the mature miRNA. One protein family acts as a key player in miRNA processing: the Argonaute (AGO) proteins. They are able to bind the duplex of mature miRNA and the target mRNA for repression of protein translation. The family of human AGO proteins consists of four members (AGO1-4), which are all responsible for translational repression, but only AGO2 is able to hydrolytically cleave the target gene transcript.

The first part of this thesis demonstrated for the first time a strong and significant reduction of all AGO proteins in melanoma as compared to melanocytes. However, this reduction is not evenly distributed among the four AGO proteins with AGO2 showing the strongest reduction. Interestingly, this was not observed in other types of cancer, hinting to a molecular process unique to melanoma.

Based on the primary results that a melanoma-specific AGO2 reduction was found, the second section of this thesis is devoted to the consequences of this phenomenon for miRNA processing and its influence on the cell. It was found that the lower AGO2 amount is responsible for a significant reduction of the siRNA and miRNAs effectiveness. With the help of a cDNA array analysis it was also found that the AGO2 modulation in melanoma affects a very large number of proteins which are involved in many important cellular processes. This is also reflected in the phenotypic alteration of the migratory potential of melanoma cells coinciding with the AGO2 reduction.

The third part of this thesis is devoted to identifying the cause of the AGO2 reduction in melanoma. The AGO reduction was only detectable by protein analysis, whereas gene expression analysis did not show any alterations, indicating a post-transcriptional regulatory mechanism. After the exclusion of the proteasome as AGO2 modulating system, it was demonstrated that miRNAs are responsible for the AGO2 reduction in melanoma cells.

SUMMARY

Since their discovery in 1993, the knowledge of miRNAs and their versatile regulatory network in the cell has grown considerably. Since then, miRNAs are also of great interest for uses in the treatment of various diseases. Thus, tumor suppressor miRNAs showing a loss-of-function in cancer can be “replaced” by a therapy involving the re-introduction of miRNAs into diseased tissues, thereby reactivating pathways that drive a therapeutic response. The results of this work, namely the strong reduction of AGO2 and the corresponding consequences in melanoma, will potentially help to increase the effectiveness of the miRNA replacement therapy strategy.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG.....	1
1	Aufbau und Funktion der humanen Haut	1
2	Melanozyten: die pigmentbildenden Zellen der Haut	2
3	Das maligne Melanom	4
4	Molekulare Ursachen des malignen Melanoms und mögliche Therapieansätze	10
5	Regulatorische RNAs im malignen Melanom	15
6	MiRNA Prozessierung	16
7	Die Argonaut Proteine	19
8	MiRNAs in der Progression des malignen Melanoms	26
II	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	31
III	ERGEBNISSE	32
1	Die Genexpression der Argonaut Proteine.....	32
2	Die Proteinexpression der Argonaut Proteine im Melanom	38
3	Die fehlregulierte AGO2 Expression ist spezifisch für das Melanom.....	42
4	Analyse der AGO2 Western Blot Banden	46
5	Die siRNA Effektivität in verschiedenen Zelltypen.....	48
6	Einfluss von AGO2 auf die Effektivität von regulatorischen RNAs	49
7	Der AGO2 Interaktionspartner GW182	55
8	AGO2 Reduktion durch Proteasomabbau	56
9	Regulierung von AGO2 durch miRNAs	59
10	Lokalisation der Argonaut Proteine	64
11	Zelluläre Beeinflussung von Melanomzellen durch eine Modulation von AGO2.....	65
12	AGO2 ist ein Regulator für die Migrationsfähigkeit von Melanomzellen	66
IV	DISKUSSION	68
1	Die miRNA Prozessierung im malignen Melanom	68
2	Ursache der AGO Reduktion im malignen Melanom	72
3	Konsequenzen der AGO2 Reduktion für das maligne Melanom.....	74
4	Bedeutung der AGO Reduktion für eine RNA basierte Therapie für das Melanom	78

V	MATERIAL	81
1	Allgemeine Materialien	81
2	Laborgeräte.....	82
3	Bakterien	83
4	Zelllinien	84
5	Oligonukleotide.....	84
6	Vektoren	87
7	Lösungen.....	89
VI	METHODEN	93
1	Allgemeine Methoden	93
2	Nukleinsäure Arbeiten.....	97
3	Protein Arbeiten.....	100
VII	LITERATURVERZEICHNIS	106

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

AGO	Argonaut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat

B

BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin

C

cDNA	engl.: complementary DNA
------	--------------------------

D

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamin-N',N',N',N',Tetraacetat
------	---------------------------------------

F

FKS	Fötales Kälberserum
-----	---------------------

K

kp	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton

L

LB	engl.: lysogeny broth
----	-----------------------

M

mA	Milliampere
mRNA	engl.: messenger RNA

N

ns	nicht signifikant
----	-------------------

P

PAA	Polyacrylamid
PBS	engl.: phosphate buffered saline
PCR	engl.: Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PVDF	Polyvinylidenfluorid

R

RIPA	Radioimmunopräzipitations-Assay
RISC	engl.: RNA-induced silencing complex
RNA	engl.: ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	engl.: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

S

SDS	engl.: Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
-----	--

T

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Borat-EDTA
TEMET	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan/Wasserstoffchlorid

U

UTR	untranslatierter Bereich
-----	--------------------------

I EINLEITUNG

Beim malignen Melanom handelt es sich um eine bösartige Tumorerkrankung, bei der sich der Primärtumor aus spezialisierten Hautzellen, den Melanozyten, entwickelt. Der nachfolgende Abschnitt liefert zunächst eine Beschreibung über den vielschichtigen Aufbau der humanen Haut, um später einen genaueren Einblick über die Lokalisation der Melanozyten zu geben.

1 AUFBAU UND FUNKTION DER HUMANEN HAUT

Die Haut (Cutis) bildet als größtes Organ des Menschen die Grenzschicht zwischen dem Körper und der Umwelt. Die Cutis hat zahlreiche Funktionen, wie beispielsweise Schutz vor schädlichen Einflüssen der Umwelt (z.B. Kälte, Hitze und Strahlung), Sinneswahrnehmung von thermischen oder mechanischen Reizen, Wärmeregulation des Körpers, Austausch und Ausscheidung (z.B. von Salzen oder Medikamenten). Darüber hinaus unterliegt die Cutis der Kontrolle des vegetativen Nervensystems (z.B. Erröten, Erblassen oder Haare sträuben).

Die Haut ist aus zwei Schichten aufgebaut: der dünneren epithelialen Epidermis (Oberhaut) und dem dickeren Bindegewebe-enthaltenden Corium (Dermis, Lederhaut), welches fließend in die Subcutis (Tela subkutanea, Unterhautgewebe) übergeht.

Die Subcutis besteht aus Bindegewebe und bildet das Grundgerüst für die darüber liegenden Hautschichten. Neben dem Bindegewebe enthält die Subcutis größere Blutgefäße und Nerven, sowie mechanorezeptorische Sinneszellen.

Die Dermis besteht hauptsächlich aus dicken Bündeln von Kollagenfasern. Die Subcutis und die Dermis werden über Blutgefäße mit Nährstoffen versorgt, wohingegen die Versorgung der Epidermis allein durch Diffusion erfolgt. Auch Nerven, Schweißdrüsen und Haarfollikel sind Bestandteil der Dermis. Eine strikte Abgrenzung der Dermis zur Epidermis bildet die lichtmikroskopisch erkennbare Basalmembran. Diese setzt sich aus der Lamina basalis (Basallamina) und der Lamina fibroreticularis zusammen. Die Basallamina wiederum besteht aus der Lamina densa und der Lamina rara, die jeweils ca. 20 nm dick sind und aus Typ IV Kollagen, Laminin sowie Proteoglykanen bestehen (Proksch *et al.* 2008).

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, welches aus den folgenden fünf Zellschichten besteht (von basal nach apikal): Basalschicht (Stratum basale), Stachelzellschicht (Stratum spinosum), Körnerzellschicht (Stratum granulosum), Glanzschicht (Stratum lucidum) und Hornschicht (Stratum corneum) (Abbildung I-1).

In der Basalschicht sind die sehr mitoseaktiven Epithelzellen über Hemidesmosomen mit der darunterliegenden Basallamina verbunden. Nach einer Zellteilung verbleibt eine Tochterzelle in der

Stratum basale, die andere rückt in die nächsthöhere Schicht, das Stratum spinosum. Diese Schicht besteht aus mehreren Lagen von Zellen mit stachelförmigen Fortsätzen (Stachelzellen), die über Desmosome mit den Nachbarzellen verbunden sind. Der als Keratinisierung bezeichnete schrittweise Verhornungsprozess von Epithelzellen über hornbildende Zellen (Keratinocyten) zu Hornzellen (Korneocyten) beginnt in der Stachelzellschicht. Zusammen mit der Basalschicht wird die Stachelzellschicht auch als Stratum germinativum (Keimschicht oder Regenerationsschicht) bezeichnet, da hier die teilungsaktiven Zellen der Haut lokalisiert sind.

In der Körner- und der Glanzschicht nimmt die Verhornung der Haut zu. Die abgeplatteten Zellen enthalten basophile Granula, die Keratohyalinkörper (enthalten Keratoyalin, welches zu Eleidin und anschließend zu Keratin umgebaut wird), Proteine und verschiedene Lipide. Der Inhalt der lamellierten Granula wird von den Zellen in den Interzellularraum abgegeben, wo er sich in Richtung Glanzschicht ausbreitet und so eine wasserabweisende Barriere bildet. Die homogen erscheinende dünne Glanzschicht, bei der keine Kerne und Zellgrenzen mehr erkennbar sind, ist stark eosinophil. Die aufsitzende Hornschicht besteht aus sehr flachen, schuppenförmigen, nicht mehr lebenden Hornzellen, die als Charakteristika eine verdickte Zellmembran, keine Zellorganellen und einen hohen Gehalt an Keratin besitzen. Die Hornschicht kann vor allem an den Hand und Fußsohlen aus mehreren hundert Schichten bestehen (Madison 2003; Ulfing 2003).

Nach dieser allgemeinen Beschreibung des Aufbaus und der Funktion der Haut, erfolgt im nachfolgenden Abschnitt eine detailliertere Darstellung der Lokalisation und der speziellen Funktion von Melanozyten.

2 MELANOZYTEN: DIE PIGMENTBILDENDEN ZELLEN DER HAUT

Die Melanozyten sind in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert und liegen der Basallamina unmittelbar auf, jedoch ohne mit dieser oder den umgebenden Keratinocyten durch Desmosomen oder Hemidesmosomen verbunden zu sein. Melanozyten kommen nicht ausschließlich in der Haut und in den Haarfollikeln der Haut vor, sondern auch in der Retina des Auges, im Ohr (Innenohr und Gehörschnecke (Cochlea)), Gehirn, Nervensystem, Lunge und Fettgewebe (Plonka *et al.* 2009).

Die Melanozyten der Haut sind gleichmäßig in der Basalschicht verteilt, wobei ein Verhältnis von 10:1 von Keratinocyten zu Melanozyten besteht. Die Dichte der Melanozyten liegt dabei bei 1.200 pro mm². Über ihre dendritischen Fortsätze stehen die Melanozyten mit ca. 30 bis 40 Keratinocyten in direktem Kontakt (Cichorek *et al.* 2013) (Abbildung I-1).

Im Gegensatz zu den Keratinocyten entstehen die Melanozyten nicht aus den Basalzellen, sondern sind neuroektodermaler Herkunft. Während der Embryogenese wandern die Melanozyten-Vorläuferzellen, die Melanoblasten, von der Neuralleiste in die Haut ein. Aus den Melanoblasten

entwickeln sich die Melanozyten durch Proliferation, Differenzierung und Migration zu ihrem Bestimmungsort in der basalen Epidermis (Lin und Fisher 2007). Die Lebensdauer von Melanozyten kann in der Epidermis mehrere Jahrzehnte andauern (Quevedo *et al.* 1969). Den Melanozyten kommt dabei die Eigenschaft zugute, eine hohe Apoptosetoleranz zu besitzen (Plettenberg *et al.* 1995). Bedingt durch die lange Lebensspanne der Melanozyten steigen die Mutationswahrscheinlichkeit der Zellen und die Gefahr der Melanomentstehung stark an.

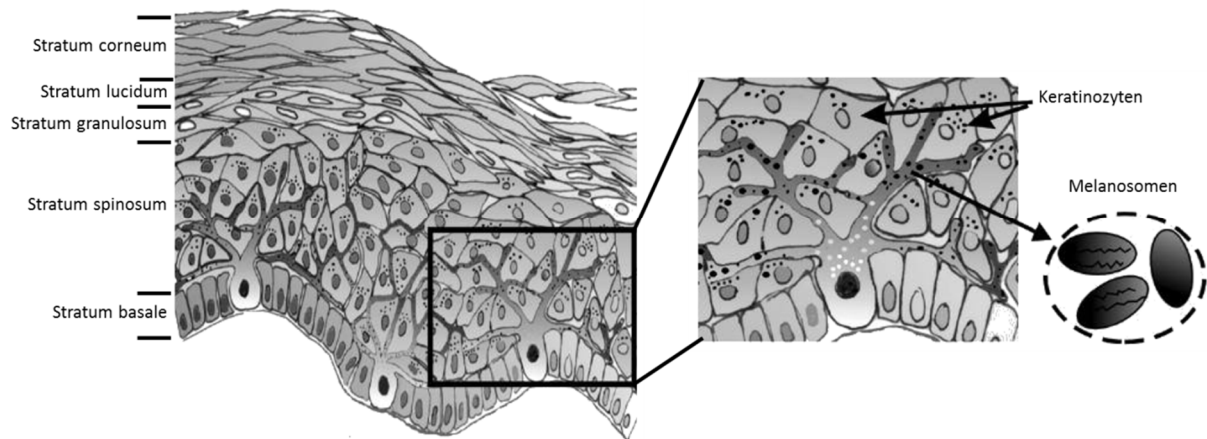


Abbildung I-1: Aufbau der Epidermis / Lage von Melanozyten in der Haut (verändert nach Cichorek *et al.* (2013)). Die Epidermis der Haut besteht aus den folgenden Schichten: Basalschicht (Stratum basale), Stachelzellschicht (Stratum spinosum), Körnerzellschicht (Stratum granulosum), Glanzschicht (Stratum lucidum) und Hornschicht (Stratum corneum). Ebenso dargestellt ist in dieser Abbildung die Lage der Melanozyten mit ihren Melanosomen, den Strukturen der Melaninproduktion, in der Epidermis.

Die Hauptaufgabe der Melanozyten besteht in der Bildung des Pigments Melanin. Durch den direkten Einfluss von ultraviolettem (UV) Licht auf die Bildung von Melanin, den als Melanogenese bezeichneten Vorgang, ist UV Licht der Umweltfaktor, der die Pigmentierung der Haut wesentlich beeinflusst.

Die Melanogenese findet in Lysosomen ähnlichen Strukturen der Melanozyten statt, den Melanosomen (Videira *et al.* 2013). Dieses Hauptcharakteristikum der Melanozyten wird im Folgenden näher beschrieben. Mit Hilfe des Enzyms Tyrosinase wird aus Tyrosin L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) hydroxyliert, welches in einer Folgereaktion ebenfalls durch die Tyrosinase sofort zu DOPAquinon oxidiert wird. Anschließend teilt sich die Enzymkaskade in zwei mögliche Wege auf: In der Anwesenheit von Cystein entsteht aus DOPAquinon 3`- oder 5`-cysteinylDOPA, welches nach Oxidation und Polymerisation zu dem gelb bis rotbraunen Phäomelanin wird. Ist Cystein nicht verfügbar, wird DOPAquinon ohne Enzymwirkung zu DOPochrome und nach einem Carbonsäureverlust zu 5,6 Dihydroxyindol (DHI), welches nach einer Oxidation und Polymerisation zu dem braun bis schwarzen DHI-Melanin wird. Aus DOPAquinon kann aber auch enzymatisch durch die DOPochrome-Tautomerase (TRP2) DHI-2-Carbonsäure (DHICA) entstehen,

welches anschließend über die Tyrosinase zu hellbraunem DHICA-Melanin wird (Sugumaran 1991; Cichorek *et al.* 2013). DHI-Melanin und DHICA-Melanin werden auch Eumelanin genannt, welches sich von dem Phäomelanin nicht nur in der Farbe, sondern auch in der Größe, Form und Packung der Melanosomen unterscheidet (Slominski *et al.* 2004; Lin und Fisher 2007). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der melaninbildenden Enzymkaskade liegt im ersten Schritt, der Hydroxylierung von Tyrosin zu DOPA.

Es wurde bereits erwähnt, dass sich aus Melanozyten eine bösartige Tumorerkrankung, das maligne Melanom entwickeln kann. Diese Erkrankung wird im nächsten Abschnitt näher charakterisiert.

3 DAS MALIGNE MELANOM

Bei dem malignen Melanom (kurz auch Melanom, Schwarzer Hautkrebs oder Melanoblastom) handelt es sich um eine hochgradig bösartige Hauttumorerkrankung, die aus den Melanozyten der Haut hervorgeht. Das Melanom kann in selteneren Fällen (0,8 - 1,8 %) auch in den Pigmentzellen des Auges (Uvea und Retina) oder als mukosales Melanom in Schleim- oder Hirnhäuten verschiedener Lokalisation entstehen (Keller *et al.* 2013; Lourenco *et al.* 2014).

Das Melanom ist mit weniger als ca. 5 % an allen Hauttumorerkrankungen beteiligt, dabei jedoch für über ca. 80 % der Hautkrebstodesfälle verantwortlich (Miller und Mihm 2006). Die hohe Mortalitätsrate des Melanoms lässt sich aus der Kombination der folgenden Eigenschaften erklären: zum einen besitzt das Melanom die Fähigkeit sehr früh über die Lymph- und Blutgefäße zu metastasieren, zum anderen zeigt das Melanom hohe Resistenz gegenüber den konventionellen Krebstherapien, wie Chemo- oder Strahlentherapie (Rockmann und Schadendorf 2003; La Porta 2007). Wird ein Melanom in einem frühen Stadium erkannt und entfernt, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei über 90 %. Nach einer Metastasierung sinkt dieser Wert auf eine 5-Jahres-Überlebensrate von 5 % mit einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 6 – 10 Monaten (Bertolotto 2013).

3.1 KLASSIFIKATION DES MALIGNEN MELANOMS

Da die meisten Melanome die Bildung von Melanin nicht einstellen, können sie gut in der Haut identifiziert werden, wodurch eine frühe Diagnose auch häufig gut möglich ist. Klinisch wird das maligne Melanom in die folgenden vier Subtypen unterteilt: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das lentigo maligna Melanom (LMM) und das akrolentiginöse Melanom (ALM) (Panizzon und Guggisberg 1999).

Das superfiziell spreitende Melanom ist mit 65 % das am häufigsten vorkommende Melanom. Es zeichnet sich durch eine Proliferation in der Epidermis aus, die zumeist in einer Ebene erfolgt. Dabei zeigt der Tumor eine unscharfe Begrenzung und unregelmäßige Pigmentierung. Diese radiale Wachstumsphase des Tumors kann sich über eine lange Zeit erstrecken und geht nach der Entfernung des Tumors mit einer guten Prognose für den Patienten einher.

Das noduläre Melanom zeichnet sich vor allem durch eine schnelle vertikale Wachstumsphase aus und ist somit das aggressivste Melanom mit der schlechtesten Prognose für den Patienten. Es tritt mit einer Häufigkeit von 25 % auf und stellt sich mit knotigen, scharf begrenzten und meist unterschiedlich pigmentierten Arealen dar. An der Hautoberfläche kann es zusätzlich zu Ulzerationen kommen.

Das lentigo maligna Melanom kommt mit einer Häufigkeit von ca. 5 % eher selten vor. Es entwickelt sich vor allem an den lichtexponierten Stellen wie im Gesicht und den Händen. Vor allem bei älteren Menschen ab 65 Jahren steigt die Inzidenz für LMM an. Der Tumor zeigt kein einheitliches Erscheinungsbild in Bezug auf die Pigmentierung oder Größe. Jedoch kommt es erst relativ spät zu einem vertikalen Wachstum, was eine gute Prognose für den Patienten bedeutet.

Das akrolentiginöse Melanom tritt ebenfalls mit einer Häufigkeit von ca. 5 % auf und ist vermehrt an den Handflächen und Fußsohlen lokalisiert. Das Aussehen des Tumors ist meist durch eine ungleichmäßige Pigmentierung bestimmt (de Braud *et al.* 2003).

3.2 INZIDENZ UND RISIKOFAKTOREN

Das Risiko für eine Erkrankung am malignen Melanom ist seit Beginn der Dokumentation in den 1970er Jahren stark angestiegen. In Europa stieg die Zahl der Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner und Jahr (Inzidenz) von 3 bis 4 in 1970 auf 10 bis 15 im Jahr 2000. In mehreren Studien wird eine weiter anhaltende Inzidenzsteigerung von jährlich 3-7 % vorhergesagt, was einer Verdopplung alle 10 bis 20 Jahre entsprechen würde. Damit stellt das maligne Melanom die am stärksten zunehmende maligne Erkrankung der kaukasischen Bevölkerungsgruppe dar (Garbe und Leiter 2009).

Eine genauere Angabe der Inzidenz kann durch den altersstandardisierten ASR-Wert erfolgen, bei dem die Häufigkeit in Erkrankungen pro 100.000 Personen-Jahren angegeben werden. Folglich ergibt sich für das maligne Melanom ein ASR-Wert von 13,0. Betrachtet man die Inzidenz des Melanoms geschlechtsspezifisch, erkrankten 42,5 Frauen (13,1 ASR) und 39,6 Männer (13,2 ASR) pro 100.000 Einwohner pro Jahr neu am Melanom. Die Mortalitätsrate liegt in Europa insgesamt bei 15,7 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr (2,2 ASR), wobei 6,9 (1,7 ASR) auf Frauen und 8,8 (2,8 ASR) auf Männer entfallen (Ferlay *et al.* 2013). Die Inzidenz des malignen Melanoms ist jedoch sehr stark

ortsspezifisch und schwankt selbst innerhalb europäischer Länder erheblich. So zeigen beispielsweise die skandinavischen Länder (Nord-Europa) einen ASR-Wert bei Frauen von 19,4 und bei Männern von 19,1 verglichen mit den Ländern des südlichen Europas, die einen Inzidenz-ASR-Wert bei Frauen von 10,0 und bei Männern von 10,1 aufweisen (Ferlay *et al.* 2013).

Risikofaktoren für die Entstehung eines Melanoms sind ein heller Hauttyp, eine blonde oder rötliche Haarfarbe, sowie eine erhöhte Anzahl an benignen oder atypischen Nävi („Muttermale“). Ein Mensch mit einer hohen Anzahl an Nävi (100-120) hat z.B. ein um das siebenfach erhöhtes Risiko an einem Melanom zu erkranken, im Vergleich mit einem Menschen mit einer niedrigen Anzahl an Nävi (0-15) (Müller 2009). Eine dunkle Haut hat im Vergleich mit einer helleren Haut nicht mehr Melanozyten, diese produzieren aber mehr Melanin und schützen somit die Haut intensiver vor DNA Schädigungen durch UV Licht. Auch die Strahlenbelastung der Erde durch das UV Licht ist nicht gleichverteilt: Australien und Neuseeland weisen eine sehr hohe Melanomrate nach, da die hellhäutige Bevölkerung einer hohen Strahlenbelastung ausgesetzt ist (Armstrong und Krickler 2001). Auch die Anzahl und Stärke von UV-Verletzungen („Sonnenbränden“) im Kindesalter erhöht das Risiko einer späteren Melanomentstehung erheblich (Behrens *et al.* 2013). Zutreffend ist dies ebenso für künstliche UV-Strahlenbelastungen durch Besuche in Solarien (Gandini *et al.* 2011). Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, die zur Entstehung des malignen Melanoms führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt, da Melanome häufig auch an wenig sonnenexponierten Stellen des Körpers auftreten. Darüber hinaus stellt auch die genetische Vorbelastung an Melanomerkkrankungen in der Familie einen wichtigen Risikofaktor dar, in Bezug auf das Risiko am Melanom zu erkranken oder ein weiteres Melanom zu entwickeln (Rastrelli *et al.* 2013).

3.3 PATHOGENESE DES MALIGNEN MELANOMS

Der US-amerikanische Dermatologe Wallace H. Clark jr. beschrieb 1984 die Pathogenese des malignen Melanoms in einem Modell, bei dem der histologische Verlauf ausgehend von normalen Melanozyten bis zum malignen Melanom in fünf Stufen dargestellt wird (Abbildung I-2) (Clark *et al.* 1984).

Die erste Stufe beschreibt eine Proliferation von strukturell normalen Melanozyten zu einem benignen Nävus. Diese werden als normale, angeborene (kongenitale) melanozytäre Nävi angesehen, die nur selten entarten. Die melanozytären Nävi zeichnen sich durch eine flache bis leicht angehobene Struktur aus und sind gleichmäßig gefärbt oder bestehen aus regelmäßigen Mustern von punktförmiger Pigmentierung, die von dem natürlichen Hautfarbton bis zum dunkelbraunen Hintergrund reicht. Histologisch haben diese Läsionen eine vermehrte Anzahl an Melanozyten die in Nestern entlang der Basalmembran angeordnet sind.

Die zweite Stufe des Clark-Modells beschreibt einen dysplastischen (atypischen) Nävus, welcher durch unkontrolliertes Wachstum gekennzeichnet ist und dabei entweder aus einem normalen Nävus hervorgeht oder vollkommen unabhängig entstehen kann. Die Läsion ist zumeist asymmetrisch mit unregelmäßigen Rändern, beinhaltet mehrere Farben und weist eine größere Ausdehnung auf. Die Melanozyten des dysplastischen Nävus können bereits ihre dendritischen Ausläufer verloren haben.

Die radiale Wachstumsphase (*radial-growth phase*, RGP), die dritte Stufe des Clark-Modells, stellt den Übergang zur malignen Läsion dar und ist gekennzeichnet durch ein radiales Ausbreiten der Zellen in der Epidermis. Dabei können die Zellen vereinzelt die Basalmembran durchdringen, scheitern aber daran, Kolonien in der Epidermis zu bilden. Die Zellen zeigen in der RGP bereits ausnahmslos eine atypische Morphologie.

In der vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP), der vierten Stufe des Clark-Modells, durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran und infiltrieren die Dermis. Die hochgradig invasiven Zellen besitzen in dieser Stufe die Fähigkeit sich in die Netzsicht der Dermis und in Fettgewebe auszubreiten und durch unkontrollierte Proliferation Tumornester zu bilden.

In der fünften Stufe des Clark-Modells, der finalen, erfolgt die Metastasierung der Melanomzellen über das Blut- und Lymphgefäßsystem in den gesamten Körper (Miller und Mihm 2006).

Sehr wahrscheinlich läuft die Entstehung des Melanoms nach diesem soeben beschriebenen fünfstufigen Clark-Modell ab. Dieses stellt aber kein striktes Modell dar, bei dem nicht einzelne Stufen ausgelassen oder mehrere übersprungen werden können. In sehr seltenen Fällen ist eine Melanomentstehung auch direkt aus Melanozyten möglich, wie z.B. bei den kongenitalen melanozytären Nävi. Die kongenitalen melanozytären Nävi treten in 1 % aller Neugeborenen auf und sind die Folge einer Fehldifferenzierung in unterschiedlichen Phasen der Embryogenese (Tannous *et al.* 2005; Das *et al.* 2013).

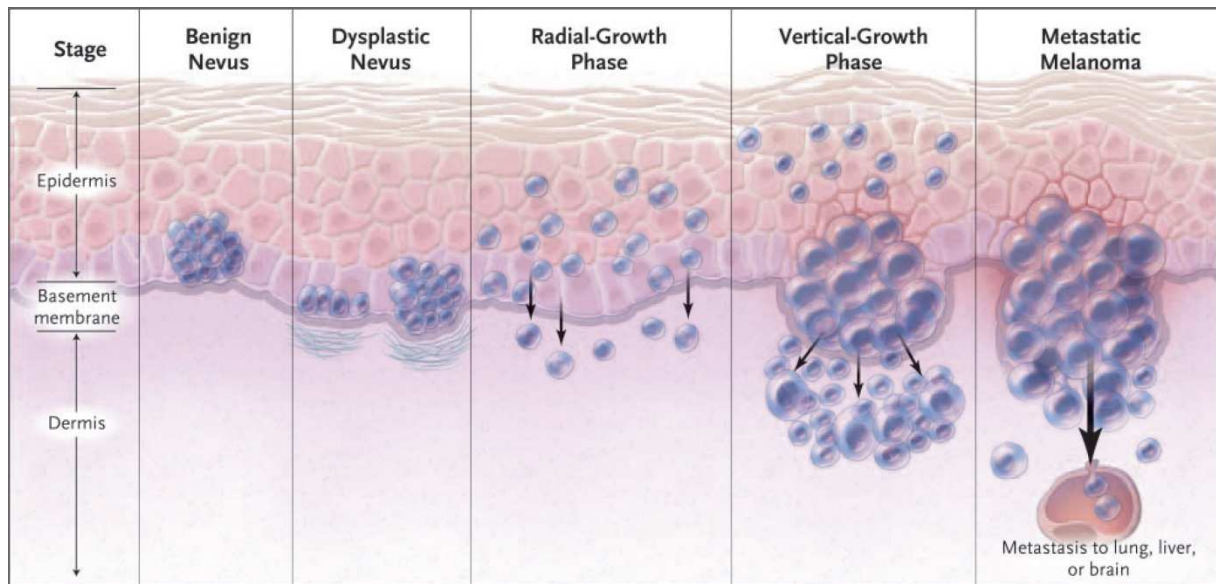


Abbildung I-2: Maligne Progression des Melanoms (verändert nach Miller und Mihm (2006)). Eine anormale Proliferation von normalen Melanozyten führt zu der Bildung eines benignen Nävus. Durch weitere schnelle Proliferation entsteht ein dysplastischer Nävus, der durch Asymmetrie und unregelmäßige Ränder gekennzeichnet ist. Die Zellen verlieren dabei ihre dendritischen Ausläufer. Die radiale Wachstumsphase (*Radial Growth Phase*) ist charakterisiert durch interepidermales Wachstum mit vereinzelter Infiltration der Dermis. Es folgt die vertikale Wachstumsphase (*Vertical Growth Phase*), die auch als dermale Invasionsphase bezeichnet wird, da die Zellen Tumornester in der Dermis ausbilden. Das maligne Melanom bildet über das Blut- oder Lymphsystem sehr schnell Metastasen in andere Organe.

3.4 PROGNOSE DES MALIGNEN MELANOMS

Bereits 1969 veröffentlichte Wallace H. Clark jr. ein histologisches Klassifikationssystem für Melanome, dessen Level später in Clark-Level benannt wurden. Die fünf Clark-Level beschreiben, welche Hautschichten durch den Tumor infiltriert wurden und geben so eine Risiko-Einschätzung für den Patienten wieder. Die Ausbreitungsfläche des Tumors an der Hautoberfläche oder das Tumolvolumen bleiben bei dieser Art der Klassifikation unberücksichtigt (Clark *et al.* 1969; Clark *et al.* 1984; Clark 1991).

- Clark-Level I keine Tumorzelle hat die Basalmembran durchbrochen
- Clark-Level II Infiltration der Tumorzellen durch die Basalmembran in die darunterliegende Papillenschicht (Stratum papillare) der Dermis
- Clark-Level III weitere vertikale Ausbreitung des Tumors bis an die Grenze zur Netzsicht (Stratum reticulare) der Dermis
- Clark-Level IV Infiltration in die Netzsicht
- Clark-Level V Invasion in die Subcutis

Ein weiteres gebräuchliches Klassifikationssystem für das maligne Melanom stellt die Dicke (*Thickness*, T) des Tumors dar. Dieses System wurde von dem US-amerikanischen Pathologen Alexander Breslow 1970 beschrieben (Breslow 1970).

In der Melanom-Datenbank des American Joint Committee on Cancer (AJCC) wurden im Jahr 2009 die Primärtumore und die 10jährige Überlebensrate von 27.639 Patienten anhand dieser Klassifikation analysiert. Die Größeneinteilung des AJCC erfolgte jedoch nicht in der Breslow Einteilung, sondern nach einer leicht veränderten Größentabelle. Die Primärtumore wurden anhand ihrer Dicke in die folgenden vier Stufen eingeteilt:

T1: ≤ 1 mm, T2: 1,01-2,00 mm, T3: 2,01-3,00 mm und T4: $\geq 3,01$ mm.

Die 10jährige Überlebensrate betrug in der Stufe T1 92 %, in der Stufe T2 80 %, in der Stufe T3 63 % und in der Stufe T4 50 % für Patienten, die einen nicht-ulzerierenden Primärtumor ohne Metastasen hatten. Im Falle eines ulzerierenden Primärtumors sinkt die Überlebensrate erheblich. Die 5jährige Überlebensrate eines Patienten mit einem T4 nicht-ulzerierendem Primärtumor liegt bei 71 %, wohingegen die Überlebensrate bei einem T4 ulzerierendem Primärtumor nur noch 53 % beträgt.

Bei Patienten mit einem metastasierenden Melanom wurde wie folgt klassifiziert:

Stufe M1a: der Patient hat eine Metastase in einer entfernten Hautregion, subkutanem Gewebe oder in einem Lymphgefäß und weist zusätzlich einen normalen Laktat Dehydrogenase (LDH) Gehalt im Blut-Serum auf (Weide *et al.* 2012)

Stufe M1b: der Patient hat Metastasen in anderen Organen als der Haut (Lunge, Leber usw.) oder eine Kombination aus Fernmetastasen in anderen Geweben und zusätzlich noch in der Haut oder im subkutanen Gewebe, jedoch ebenfalls mit einem normalen LDH-Wert

Stufe M1c bedeutet: der Patient hat eine Metastase in einem anderen Gewebe als der Haut in Kombination mit einem erhöhten LDH-Wert

Die einjährige Überlebensrate von 7.972 analysierten Patienten der Stufe T4 ergab eine Überlebensrate von M1a 62 %, mit M1b 53 % und M1c 33 % (Balch *et al.* 2009).

Das frühe Erkennen und Entfernen eines Melanoms, insbesondere vor einer Metastasierung, ist die einzig effektive Therapie die für das Melanom existiert. Derzeit bleibt bei steigender Inzidenz die Mortalitätsrate konstant, was dem verbesserten Gesundheitswesen in den Industrieländern, den immer stärker sensibilisierten Ärzten und einer besseren Aufklärung der Bevölkerung zu verdanken ist. Jedoch kann es auch im Anfangsstadium der Erkrankung, selbst bei geringer Tumordicke zu Fernmetastasen kommen und durch die hohe Resistenz gegenüber den konventionellen Krebstherapien ist die Suche nach geeigneten Therapieansätzen von enormer Wichtigkeit.

Im nachfolgenden Absatz werden daher die molekularen Ursachen des malignen Melanoms und daraus resultierende mögliche Therapieansätze beschrieben.

4 MOLEKULARE URSACHEN DES MALIGNEN MELANOMS UND MÖGLICHE THERAPIEANSÄTZE

Die molekularen Ursachen die zur Entstehung und Progression des malignen Melanoms beitragen, sind sehr vielfältig und betreffen nahezu alle Bereiche der Zellorganisation. Im Folgenden werden einige Zellprozesse exemplarisch beschrieben, die die Komplexität der Melanomentstehung verdeutlichen. Es werden Beispiele der Fehlregulation von Rezeptorproteinen, Signalwegen und Transkriptionsfaktoren aufgezeigt.

4.1 FEHLREGULATION VON REZEPTORPROTEINEN

Rezeptorproteine interagieren in der Regel mit den für sie spezifischen Liganden nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip und initiieren durch diese Interaktion bestimmte Folgereaktionen.

In Tumorzellen sind diese Informationen häufig durch eine Expressionsänderung der Rezeptoren oder Liganden fehlgeleitet, was zu tumorspezifischen Zelländerungen führen kann.

Die 58 bekannten humanen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) bilden die größte Familie innerhalb der Onkogene. Sie zeichnen sich durch einen homologen Aufbau aus, bestehend aus einer intrazellulären katalytischen Domäne und einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne (Schlessinger 2000). Innerhalb dieser Rezeptorfamilie dienen die folgenden vier RTKs als Beispiel zur Verdeutlichung des Einflusses dieser Rezeptorfamilie auf das Melanom: KIT, *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *vascular endothelial growth factor receptor* (VEGFR) und c-Met (MET).

KIT, der Rezeptor für den Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF) ist in Melanozyten ein wichtiger Faktor für das Überleben, die Migration, die Proliferation und die Differenzierung der Zellen (Carvajal 2013). Die KIT Expression in Melanomzellen ist im Vergleich zu Melanozyten reduziert, jedoch kann in Patienten mit einem metastasierenden Melanom auch eine gesteigerte KIT Expression vorkommen. Eine Phase II Studie mit dem KIT Inhibitor Imatinib zeigte nur eine geringe klinische Wirksamkeit des Inhibitors (Kim *et al.* 2008). EGFR hat Einfluss auf die Differenzierung und Proliferation von Melanomzellen und zeigt in diesen Zellen eine gesteigerte Expression im Vergleich zu Melanozyten (Sparrow und Heenan 1999). Erlotinib, ein Inhibitor für den EGF-Rezeptor, konnte keine klinische Wirksamkeit in einer Phase II Studie nachgewiesen werden (Kwong *et al.* 2007). VEGFR ist in Melanozyten, im Gegensatz zu Melanomzellen, bedingt durch die Abwesenheit des Liganden, nicht aktiv. Der VEGFR Inhibitor Sunitinib bewirkt durch Inaktivierung des Akt/mTOR Signalweges bei

Zellen, die über einen aktiven VEGFR verfügen, einen Stopp des Zellzyklus in der G1 Phase (Yeramian *et al.* 2012).

Die RTK MET dient als Rezeptor für den *hepatocyte growth factor* (HGF) und hat Einfluss auf die Zellteilungsrate und das invasive Potential von Tumorzellen. MET ist in Melanozyten und Melanom-Primärtumorzellen nur schwach exprimiert, jedoch steigt die MET-Expression in Melanommetastasen stark an. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die MET Konzentration in der Progression des malignen Melanoms wahrscheinlich eine Rolle spielt und verantwortlich ist für eine gesteigerte Zellmotilität und ein gesteigertes invasives Potential (Migliore *et al.* 2008; Swoboda *et al.* 2012).

Der Rezeptor für den *insulin-like growth factor 2* (IGF2), *insulin-like growth factor 2 receptor* (IGF2R), ist verantwortlich für die Regulation von mehreren wichtigen Zellprozessen, wie beispielsweise Wachstum, Embryonalentwicklung, Differenzierung und Regulation des Metabolismus (Soares *et al.* 2010).

Integrine sind eine Familie von Zelladhensions-Rezeptoren, die als Heterodimere aus einer von 17 möglichen alpha- und einer von 8 möglichen beta-Untereinheiten bestehen. Derzeit sind 20 verschiedene Integrine bekannt und beschrieben, die u. a. Fibronectin, Vitronectin und verschiedene weitere Matrixproteine binden und dadurch Zell-Matrix Adhesion und Zell-Zell Aggregation ermöglichen können (Seftor 1998). Melanomzellen weisen im Vergleich zu Melanozyten eine viel stärkere Integrin $\beta 3$ Expression auf, was in einem aggressiven Tumorwachstum, einer gesteigerten Invasion und Metastasierung der Melanomzellen resultiert (Albelda *et al.* 1990).

Das Protein *neurogenic locus notch homolog protein 4* (Notch4) ist ein evolutionär sehr konservierter Transmembran-Rezeptor, der bei Ligandenbindung enzymatisch gespalten wird. Eine bei dieser Enzymreaktion entstehende Notch Interzellulardomäne (NIC) rekrutiert einen transkriptionalen Aktivatorkomplex im Nukleus, wodurch die Proliferation der Zelle und die Differenzierung reguliert werden. In den Melanomzellen ist die Expression des Notch4 Rezeptors im Vergleich zu Melanozyten sehr stark reprimiert (Costa *et al.* 2009).

4.2 FEHLREGULATION VON SIGNALWEGEN

Signalwege stellen das Bindeglied zwischen der Reizaufnahme an der äußeren Zellmembran und der Genexpression im Zellkern dar. In vielen Tumoren wurden fehlregulierte Signalwege als Tumormerkmale beschrieben, u.a. auch für das Melanom.

Eine häufig im Melanom vorkommende Fehlregulation betrifft den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg RAF-RAS-MEK-ERK. In 70 % aller Melanome handelt es sich um eine onkogene somatische Mutation in den Genen *BRAF* oder *NRAS* (Besaratinia und Tommasi 2014). Vor allem der einzelne Basenaustausch (Thymidin zu Adenin an Nukleotid-Position 1799) des Codons 600 im *BRAF*

Gen betrifft 92 % der Mutationen dieses Protoonkogens im humanen Melanom. Diese Mutation alleine ist nicht ausreichend für die Entstehung des Melanoms, da auch ein benigner Nävus sehr häufig diese Mutation enthält (Garnett und Marais 2004; Besaratinia und Tommasi 2014). In einem Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer *BRAF*^{V600E} Mutation zwar eine benigne melanozytäre Hyperplasie entwickeln, aber es erfolgt keine Melanomentstehung in den Mäusen bis zu einem Lebensalter von 15 – 20 Monaten. Kommt es jedoch zusätzlich zu einem Verlust des Tumor-Suppressors *Phosphatase and Tensin homolog from chromosome 10* (PTEN), erkrankten die Mäuse zu 100 % an einem Melanom (Dankort *et al.* 2009). Der zur Melanombehandlung zugelassene Serin-Threonin-Kinase Inhibitor Vemurafenib ist spezifisch für das Onkoprotein *BRAF*^{V600E}. Vemurafenib führte in ersten klinischen Studien zu sehr hohen Tumorregressionen von bis zu 70 % (Chapman *et al.* 2011). Jedoch steigt mit zunehmender Behandlungsdauer die Wahrscheinlichkeit einer Resistenz-Bildung deutlich an (Das Thakur *et al.* 2013). Darüber hinaus ist die Diagnostik der aktivierenden Mutation zwingend nötig, da die Behandlung von Patienten ohne Mutation zu einem kürzeren Überleben führt und somit klar kontraindiziert ist. Die Überlebensrate (*overall survival*, OS) der Melanom-Patienten, die mit Vemurafenib behandelt wurden (OS = 13,6 Monate) ist im Vergleich mit Dacarbazin (Zytostatikum) behandelten Melanom-Patienten (OS = 9,7 Monate) deutlich höher (Keating, 2012).

Der PI3K-AKT-mTOR Signalweg ist ein weiterer Signalweg, der in die Melanomentstehung involviert ist. Die Phosphatase PTEN ist verantwortlich für die Hemmung dieses Signalweges durch Dephosphorylierung von signalübertragenden Molekülen (Phosphatidylinositolphosphaten) die von der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) gebildet werden. Eine Hemmung des Tumorsuppressors durch Mutationen im *PTEN* Gen, konnten in 10 % – 15 % der Melanom-Primärtumore identifiziert werden (Tsao *et al.* 1998). Die Expression des Proteinkinase B Gens *AKT* korreliert mit der Progression des Melanoms. Nur aktives *AKT3*, und nicht *AKT1* und *AKT2*, wird während der Progression bis zum höchsten Level im fortgeschrittenen Stadium des metastasierenden Melanoms verstärkt exprimiert (Stahl *et al.* 2004). Einige Studien konnten zeigen, dass eine Aktivierung von *AKT3* als direkte Folge einer gesteigerten Phosphorylierung und somit Inaktivierung von pro-apoptotischen Proteinen zu einer Hemmung der Apoptose führt (Ko und Fisher 2011).

Die Kinase *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) kann in zwei Komplexen vorliegen, mTOR Komplex 1 (mTORC1) und mTOR Komplex 2 (mTORC2). Der aktive mTOR Komplex 1 führt zur Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren 4E-BP1 (*eukaryotic initiation factor 4E* (eIF-4E) *binding protein-1*) und S6K1 (*protein S6 kinase 1*). Der mTOR Komplex 2 stimuliert die AKT-Signalkaskade durch eine Phosphorylierung von AKT (Molhoek *et al.* 2005). Die Inhibition von mTOR durch den mTOR Inhibitor Rapamycin zeigt keine Effekte auf das Wachstum von Melanomzellen (Lasithiotakis *et*

al. 2008). Auch in einer klinischen Studie der Phase II wurde beobachtet, dass das Rapamycin Analogon CCI-779 bei Patienten mit einem metastasierenden Melanom keine Wirkung zeigt (Margolin *et al.* 2005). Rapamycin in Kombination mit dem RAF Inhibitor Sorafenib bewirkt jedoch eine signifikante Wachstumshemmung von Melanomzellen (Lasithiotakis *et al.* 2008).

Das Tumorsuppressorgen INK4A des p16^{INK4A}-cDK4/6-RB Signalweges inhibiert die Cyclin D1 abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6, wodurch der Tumorsuppressor RB (Retinoblastoma Protein) aktiviert wird (Halaban 2005). Eine Fehlregulation dieses Signalweges ist in 90 % der malignen Melanome nachweisbar und steht daher im Fokus als möglicher Therapieansatz. Der Verlust der p16^{INK4A} Proteinexpression während der Progression des Melanoms führt durch eine Phosphorylierung von RB zur direkten CDK Aktivierung, was eine Freisetzung des Proliferations-fördernden Transkriptionsfaktors E2F zur Folge hat. In vorklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von CDK4 einen therapeutischen Nutzen für Patienten haben, deren CDK4 Anstieg auf einem Verlust von *CDKN2A* (p16^{INK4A}) beruht. Bei Patienten mit einem Verlust von RB1 hingegen kommt es vermehrt zu Resistenzbildungen gegenüber dem Inhibitor (Sheppard und McArthur 2013).

4.3 FEHLREGULATION VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Transkriptionsfaktoren spielen in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms eine große Rolle. Eine Veränderung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren in den Zellen kann zur malignen Transformation führen. Im Folgenden sind einige Transkriptionsfaktoren aufgeführt, deren Fehlregulation zur Tumorprogression und Metastasierung im malignen Melanom beitragen.

Der Transkriptionsfaktor MITF (Microphthalmie assoziierter Transkriptionsfaktor) ist bekannt als der Hauptregulator von pigmentierten Zellen und gehört zu der Myc Familie der Helix-loop-helix-Transkriptionsfaktoren. MITF ist für Entwicklung, Überleben, Proliferation und Zellzyklus-Progression von Melanozyten verantwortlich, da er die Expression wichtiger Gene der Melanogenese kontrolliert (z.B. Tyrosinase (TYR), *tyrosinase-related protein 1* (TYRP1), MLANA (Melan-A) und *silver locus protein homolog* (SILV)) (Bell und Levy 2011). Die Expression von MITF ist in Melanomzellen nicht konstant. Ca. 10 % - 20 % der Melanomzellen weisen eine Amplifikation der MITF Expression auf, die häufig in Verbindung mit einer BRAF Mutation steht und die Proliferation und das Überleben des Tumors fördert. Im Verlauf der Progression kommt es jedoch zu einem Absinken der MITF Expression, was zu einer verringerten Differenzierung und einer erhöhten Invasionsfähigkeit der Zellen führt, wobei eine MITF Repression über einen längeren Zeitraum Seneszenz induzieren kann (Hoek und Goding 2010; Bell und Levy 2011).

Snail1 ist ein Transkriptionsfaktor und ein direkter Repressor der Expression des transmembranen Glykoproteins E-Cadherin. E-Cadherin ist ein wichtiges Zelladhäsionsmolekül für die „Melanozyten-Keratinozyten-Kommunikation“ und aufgrund der gesteigerten Snail1 Expression stark reprimiert in der Progression des Melanoms (Poser *et al.* 2001). Dies erleichtert es den Tumorzellen sich aus dem engen Verband mit den Keratinozyten zu lösen. Der veränderte Snail1 Status führt zudem zu einer Expressionsminderung des Tumorsuppressors CYLD (cylindromatosis), welcher die Proliferation und Metastasierung unterdrückt (Massoumi *et al.* 2009).

Das Protein des Onkogens *v-ski* inhibiert den TGF- β Signalweg durch die Bindung des Smad Proteins, welches für die Signalweiterleitung in den Zellkern verantwortlich ist. Zudem kann SKI den Wnt (*wingless-type MMTV integration site family*) und den β -Catenin Signalweg induzieren und die MITF und Nr-CAM (*neuronal cell adhesion molecule*) Expression steigern. Durch diese Signalwegseinbindung beeinflusst das SKI Protein die Proliferation, Kolonisierung und Migration durch eine gesteigerte Expression im Melanom (Chen *et al.* 2003; Levati *et al.* 2011).

Hox (Homebox) Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die in der frühen Embryogenese die Zellidentität, Wachstum, Differenzierung, Zell-Zell und Zell-Matrix-Interaktion steuern. Im Melanom zeigen die beiden Hox Proteine Hox-C8 und Hox-B7 eine gesteigerte Expression gegenüber Melanozyten, welche verantwortlich ist für eine Erhöhung des Metastasierungspotentials und eine geringere Differenzierungsrate (Braig *et al.* 2010; Mueller und Bosserhoff 2011). Auch Hox-C13 zeichnet sich durch eine gesteigerte Expression im metastasierenden Melanom im Vergleich zu Melanozyten oder Melanom Primärtumorzellen aus und könnte daher als Marker für die Metastasierung verwendet werden (Cantile *et al.* 2012).

cJun ist ein wichtiger Regulator in der Progression des malignen Melanoms und ein Mitglied in der Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren dieser Familie (JUN, JDP, FOS/FRA, ATF/CREB und MAF) sind als Regulatoren der Progression, Proliferation, Migration, Invasion, Apoptose und Angiogenese im Melanom beschrieben. Die cJun Aktivierung erfolgt durch eine Phosphorylierung durch die cJun N-terminale Kinase (JNK) oder durch die Kinasen ERK1, ERK2 oder GSK3 β (Kappelmann *et al.* 2014).

Zu der Familie der AP-2 (*activator protein-2*) Transkriptionsfaktoren gehören AP2alpha, AP2beta, AP2gamma und AP2delta. Sie sind an der Regulation vieler wichtiger Zellprozesse beteiligt, z.B. Apoptose, Zellwachstum und Differenzierung während der Embryogenese. AP2alpha ist als Tumorsuppressor im Brustkrebs, Darmkrebs und im malignen Melanom beschrieben. Zellkulturversuche zeigten bei einer Überexpression von AP2alpha eine Hemmung der Zellteilung und der Bildung stabiler Kolonien, wohingegen eine Verringerung der AP2alpha Konzentration zu einer Steigerung des invasiven Potentials und der Tumorbildung führt (McPherson *et al.* 2002).

RUNX3 (*runt-related transcription factor 3*) ist ein Tumorsuppressor, dessen genaue Regulationsmechanismen noch weitestgehend unbekannt sind. Jedoch zeigt eine reduzierte RUNX3 Expression im Melanom durch Regulation der Proliferation, Apoptose und Metastasierung einen Einfluss auf die Entwicklung und Progression des Tumors (Zhang *et al.* 2011).

Nach der Beschreibung der molekularen Ursachen des malignen Melanoms und den daraus resultierenden möglichen Therapieansätzen, folgt im nächsten Abschnitt ein Überblick über die Rolle regulatorischer RNAs im malignen Melanom.

5 REGULATORISCHE RNAs IM MALIGNEN MELANOM

Eine Krebszelle weist im Allgemeinen immer eine unkontrollierte Vermehrung auf, die auf einer sogenannte „Entartung“ körpereigener Zellen basiert. Dies kann verschiedenste Ursachen haben, wie z.B. eine Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren, Signalkaskaden oder Rezeptoren (Völler *et al.* 2013; Luo *et al.* 2014). Derzeitige Therapieansätze konzentrieren sich zumeist darauf, fehlregulierte Proteine direkt zu beeinflussen und deren Fehlregulation aufzuheben (Shtivelman *et al.* 2014). Eine Veränderung in der Expressionsstärke eines bestimmten Proteins kann auch durch regulatorische RNAs verursacht werden. Regulatorische RNAs eignen sich aufgrund dieser Tatsache prinzipiell ebenfalls als Krebstherapieansatz (Greenberg *et al.* 2014).

Regulatorische RNAs sind kleine RNA Moleküle, deren Information zumeist endogen im nicht proteinkodierenden Genom der Zelle vorliegt. Die Bedeutung von kleinen RNA Moleküle ist seit ihrer Entdeckung in den 1990er Jahren immer stärker in den Fokus aktueller Untersuchungen gelangt. Die drei möglichen Wege der post-translationalen Hemmung der Genexpression durch das *RNA interference* (RNAi) System, zu welchem *micro RNAs* (miRNAs), *small interfering RNAs* (siRNAs) und *piwi-interacting RNAs* (piRNAs) gehören, haben ein gemeinsames Funktionsprinzip. Basis hierfür ist ein Ribonukleotid-Protein-Komplex, der aus mindestens einem Mitglied der Argonaut Familie und einer ca. 20-30 Nukleotiden langen, zur Ziel-RNA komplementären, RNA besteht (Wilson und Doudna 2013). Dieser Komplex wird als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet, da er für die Hemmung der Translation die entscheidende Struktur darstellt. Sowohl bei siRNAs, als auch bei miRNAs, wird der RISC mit einer doppelsträngigen RNA beladen. Diese besteht üblicherweise aus ca. 19 Watson-Crick-Basenpaaren mit einem Überhang von zwei Nukleotiden am 3'Ende und jeweils einer Phosphatgruppe am 5'Ende der RNA (Jackson und Standart 2007). Einer der beiden RNA-Stränge verlässt den RISC und wird im Anschluss direkt abgebaut. Der Strang, der den RISC verlässt wird als *passenger* Strang bezeichnet, während der *guide* Strang im RISC verbleibt und als Matrize für die Ziel-RNA dient. Das menschliche Genom kodiert für mehr als tausend miRNAs (Griffiths-Jones *et al.* 2008) und reguliert durch diese schätzungsweise 60 % der Proteinexpressionen (Friedman *et al.*

2009). Dieser große Einfluss der miRNAs spiegelt sich auch in der miRNA basierten Modulation von wesentlichen Zelleigenschaften, wie beispielsweise der Proliferation (Kappelmann *et al.* 2013), Invasion (Muller und Bosserhoff 2008) oder Migration (Braig *et al.* 2010) wieder. Es ist daher auch anzunehmen, dass miRNAs in der Progression des Melanoms eine tragende Rolle spielen. Im nächsten Abschnitt erfolgt daher eine detaillierte Darstellung der miRNAs. Die Rolle der miRNAs in der Progression des malignen Melanoms wird hingegen in Kapitel 8 der Einleitung beschrieben.

6 MIRNA PROZESSIERUNG

Die miRNA Prozessierung ist ein genau regulierter und mehrschrittiger Prozess, dessen mögliche Fehlregulation eine Rolle in der Progression des malignen Melanoms spielen könnte. Da diese Thematik einen wesentlichen Teil der vorliegenden Arbeit ausmacht, werden im Folgenden die miRNA Prozessierung inklusive ihrer Schlüsselproteine vorgestellt.

MiRNAs sind kurze RNA Moleküle, die nicht für ein Protein kodierend sind. Sie entstehen ausschließlich durch endogene Transkription mit Hilfe der RNA-Polymerase II. SiRNAs hingegen können zusätzlich zur endogenen Transkription auch durch virale Infektion oder andere exogene Quellen in die Zelle gelangen (Watanabe *et al.* 2008; Carthew und Sontheimer 2009). Kodiert ein eigenständiges Gen die siRNA oder miRNA, wird dies als monocistronisch bezeichnet. Eine polycistronische Kodierung liegt vor, wenn mehrere siRNAs oder miRNAs von einem Gen kodiert werden. Eine weitere Möglichkeit der siRNA oder miRNA Kodierung im nicht proteinkodierenden Genom besteht in den Introns eines Gentranskriptes, dies wird als intronisch bezeichnet (Filipowicz *et al.* 2008).

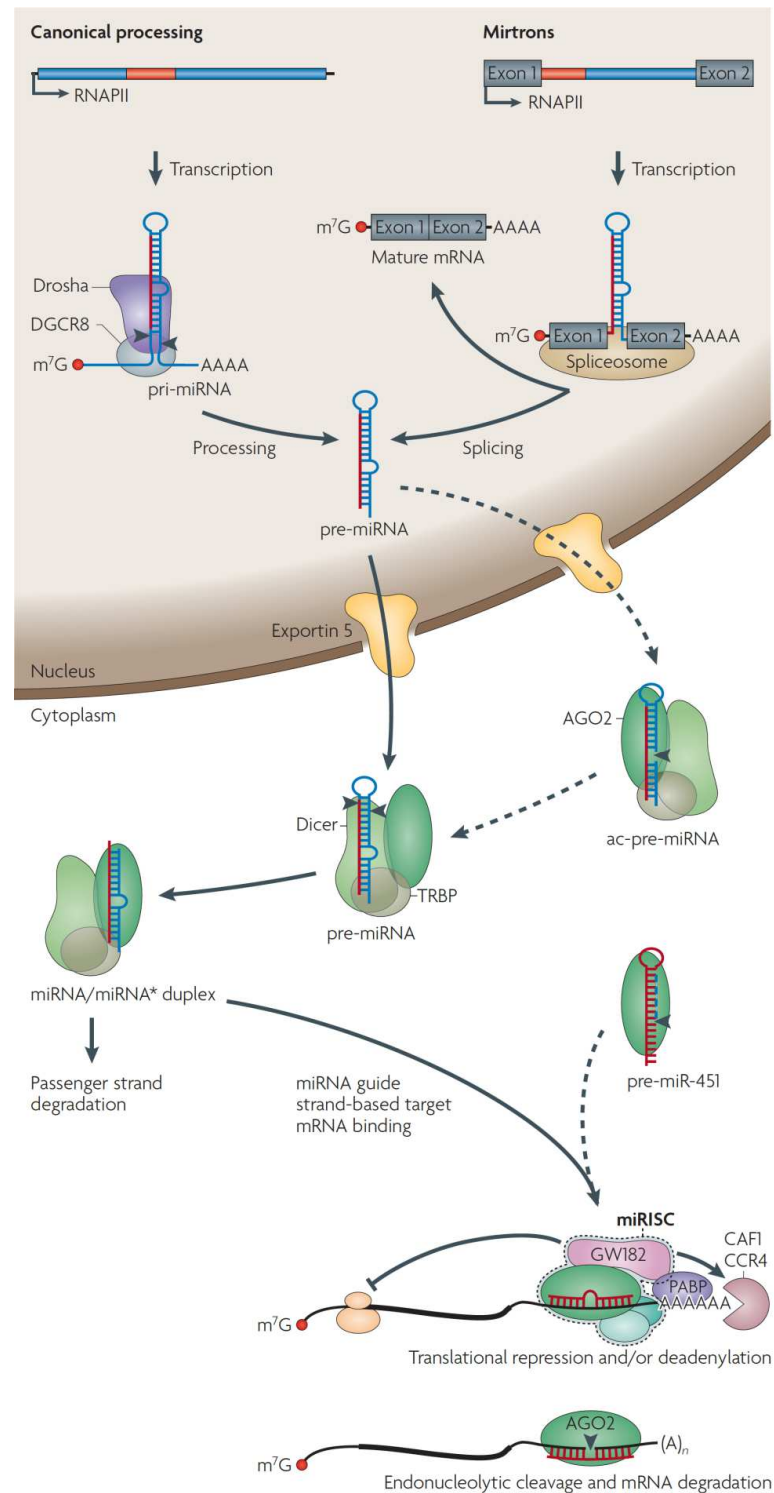


Abbildung I-3: Schematische Darstellung der Biogenese und der Funktion von miRNAs (verändert nach Krol *et al.* (2010)).

MiRNAs werden aus einem miRNA Primärtranskript (pri-miRNA) prozessiert, welche durch die RNA-Polymerase II, entweder aus dem nicht proteinkodierenden Genom oder aus Introns von proteinkodierenden Genen (Mirtrons), transkribiert werden. Der Mikroprozessorkomplex (Drosha, Pasha) spaltet die pri-miRNA und generiert die pre-miRNA. Die pre-miRNA wird durch Exportin5 ins Zytoplasma transportiert, wo Dicer die mature miRNA generiert. Ein Strang der maturen miRNA interagiert mit AGO2 und bindet partiell oder vollständig komplementäre Bereiche der Ziel-mRNA. Dies führt zur Repression der Proteintranslation oder zu einer Deadenylierung der mRNA.

Die *primary miRNA* (pri-miRNA) ist das Primärtranskript einer miRNA und ist aus bis zu 1.000 Nukleotiden aufgebaut. Der primären Transkription folgt eine schrittweise Prozessierung des Primärtranskriptes bis zur maturen miRNA über eine Enzymkaskade (Abbildung I-3). Zuerst faltet sich die pri-miRNA in einzelne oder in Cluster formierte Haarnadelstrukturen, welche sich durch einen sequenzkomplementären RNA Doppelstrang auszeichnen, der durch eine ca. 10 Nukleotide lange distale Schlaufe verbunden ist (Saini *et al.* 2007). Diese RNA Haarnadelstrukturen dienen dem Enzym Drosha, einer RNase III, und *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8), einem Protein mit zwei doppelsträngige RNA bindenden Domänen (dsRBD), als Substrat. Dabei bilden sie zusammen mit der RNA und den Helicasen p68 und p72 (Fukuda *et al.* 2007) den Mikroprozessorkomplex, der die pri-miRNA in die *precursor RNA* (pre-miRNA) überführt. Bei diesem Vorgang erkennt das Protein DGCR8 den Übergang der Haarnadelstruktur von der Einzelstrang- zur Doppelstrang-RNA und positioniert Drosha an die für die hydrolytische Spaltung erforderliche richtige Stelle. Anschließend spaltet Drosha den RNA-Doppelstrang ca. 11 Nukleotide entfernt von dem Übergang von der Einzelstrang- zur Doppelstrang-RNA. Die entstandene pre-miRNA weist eine Länge von ca. 65-70 Nukleotiden auf (Han *et al.* 2006).

Das Protein Exportin-5 transportiert in Anwesenheit des Kofaktors RanGTP die pre-miRNA aus dem Kern in das Zytoplasma (Lund und Dahlberg 2006). Die Endoribonuklease Dicer ist dafür verantwortlich, doppelsträngige RNA oder die pre-miRNA in RNA-Doppelstränge mit spezifischer Länge zu schneiden. Dabei ist Dicer von dem Doppelstrang-RNA Bindeprotein (RBP; *double-stranded partners*) *transactivation-responsive* (TAR) RBP abhängig (Chendrimada *et al.* 2005). Sinkt die Menge an verfügbarem TRBP, führt dies zu einer Destabilisierung von Dicer und die pre-miRNA-Prozessierung wird deutlich ineffektiver (Melo *et al.* 2009). Dicer ist ein ca. 200 kDa großes Protein, welches einen Multi-Domänen Aufbau hat, welcher Ähnlichkeiten zu Ribonucleasen III zeigt. Die Familie der RNase III zeichnet sich dadurch aus, dass sie doppelsträngige RNA spalten kann, wobei ein 2 Nukleotide langer Überhang am 3'Ende entsteht. Dicer ist fähig, die pre-miRNA in 20-24 Nukleotide lange RNA Fragmente zu spalten und ist in das Beladen des RISCs involviert.

Darüber hinaus gibt es die Möglichkeit einer Dicer unabhängigen miRNA-Prozessierung. Dabei übernimmt die katalytische Aktivität des Proteins Argonaut2 (AGO2) die Spaltung der RNA und erzeugt ein Zwischenprodukt mit einem neuen 3'Ende, welches anschließend weiter degradiert wird. Die Dicer unabhängige miRNA-Prozessierung wurde durch AGO2 knock-out Maus-Mutanten entdeckt, welche homozygot für ein katalytisch inaktives AGO2 sind und kurz nach der Geburt durch eine Anämie sterben. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die miRNA-451, die für die Erythropoese verantwortlich ist, in diesen Mutanten nicht mehr gebildet werden kann. Durch *in vitro* Versuche

konnte die direkte Beladung von AGO2 mit der pre-miRNA-451 nachgewiesen werden (Cheloufi *et al.* 2010).

AGO2 kann ebenfalls zu den miRNA prozessierenden Proteinen gezählt werden, da es nicht nur die mature miRNA mit dem zu inhibierendem Gentranskript verbindet, sondern auch aktiv an der miRNA Prozessierung teilnimmt. Dabei spaltet AGO2 die pre-miRNA 12 Nukleotide vom 3'Ende entfernt zu einem Zwischenprodukt, welches als Ago2-cleaved precursor miRNA oder kurz ac-pre-miRNA bezeichnet wird (Diederichs und Haber 2007). Die genaue Funktion dieses Prozessierungsschrittes ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird spekuliert, dass es sich dabei entweder um einen Selektionsmechanismus handelt, bei dem festgelegt wird, welcher der beiden RNA-Stränge abgebaut wird (*passenger* Strang) und welcher zur maturen miRNA (*guide* Strang) reift. Eventuell trägt die Spaltung am 3'Ende auch dazu bei, die miRNA Duplexstruktur leichter aufzulösen. Grund hierfür ist eine verringerte Annealingtemperatur und eine Verringerung der freien Energie der Duplexstruktur nach der Aktivität von Dicer (Diederichs und Haber 2007). Welcher der beiden RNA Stränge die *guide* RNA wird, also die RNA, die im RISC das Argonaut zur Ziel-mRNA führt, ist üblicherweise der Strang, der das thermodynamisch instabilere 5'Ende aufweist (Khvorova *et al.* 2003; Schwarz *et al.* 2003; Frank *et al.* 2010).

7 DIE ARGONAUT PROTEINE

Die Argonaut (AGO) Proteine stellen eine direkte Verbindung zwischen dem zu regulierenden Genexpressionstranskript und der kurzen sequenzkomplementären regulatorischen RNA her.

Die Proteinfamilie erhielt ihren Namen 1998 von der Arbeitsgruppe Bohmert, da *Arabidopsis thaliana* AGO1 *knock-out* Pflanzen einen Phänotyp zeigten, der stark an die tentakelartige Gestalt des Tintenfisch *Argonauta argo* erinnert (Bohmert *et al.* 1998). AGO Proteine kommen in fast allen Eukaryoten vor, wobei Ihre absolute Konzentration auf $1,4 \times 10^5 - 1,7 \times 10^5$ AGO Proteine pro Zelle, sowohl im Menschen als auch in der Maus, geschätzt wird (Wang *et al.* 2012). Die einzig bisher beschriebene Ausnahme stellt die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* dar, die keine AGO Proteine besitzt und die gänzlich auf eine Genregulation durch miRNA verzichtet (Drinneberg *et al.* 2009).

Die eukaryotischen Argonaut Proteine lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die eine Gruppe umfasst überwiegend zytoplasmatischen AGO Proteine, welche mit miRNAs und siRNAs die Genexpression post-transkriptional regulieren (Mallory und Vaucheret 2010; Meister 2013). Die zweite Gruppe beschreibt die *P-element-induced wimpy testes* (PIWI) Proteine, welche an piRNAs binden und vorrangig die Genregulation in Keimzellen beeinflussen (Luteijn und Ketting 2013; Ross *et al.* 2014). Eine weitere Gruppe von AGO Proteinen, die WAGO Proteine, die die Keimzellgenexpression regulieren, sind spezifisch für den Fadenwurm *C. elegans* (Gu *et al.* 2009). Die Anzahl der Argonaut

Proteine innerhalb verschiedener Spezies ist sehr variabel, z.B. besitzt *Drosophila melanogaster* zwei (AGO1 und AGO2), *Homo sapiens* vier (AGO1-4), und *Arabidopsis thaliana* sogar zehn (AGO1-10) (Mallory *et al.* 2008) Argonaut Proteine.

Auskunft über den Aufbau und die Domänenanordnung von vollständigen Argonaut Proteinen geben derzeit vier verschiedenen Kristallstrukturen. Aus humanem Argonaut2 (hAGO2) wurden bisher zwei Strukturen veröffentlicht (Elkayam *et al.* 2012; Schirle und MacRae 2012). Eine dieser Strukturen ist in Kombination mit miRNA-20a dargestellt (Abbildung I-4) (Elkayam *et al.* 2012). Eine weitere Kristallstruktur zeigt das humane Argonaut1 (hAGO1) mit gebundener miRNA-let7 (Faehnle *et al.* 2013). Die vierte bekannte Struktur wurde aus der Hefe *Kluyveromyces polysporus* (KpAGO), ebenfalls mit gebundener RNA, generiert (Nakanishi *et al.* 2012). Anhand der Strukturen ist zu erkennen, dass der Multi Domänen Aufbau von Argonaut1 und Argonaut2 übereinstimmt und sich auch zwischen den eukaryotischen und der prokaryotischen Struktur keine Unterschiede in Bezug auf die Domänenanordnung zeigen. Dies lässt einen hohen Konservierungsgrad vermuten.

Der Argonaut Multi-Domänen-Aufbau besteht aus den vier globulären Domänen Amino-terminal (N), PAZ (PIWI-Argonaute-Zwille), MID (middle) und PIWI (P-element-induced wimpy testes), welche über die zwei Linker L1 und L2 miteinander verbunden sind (Schirle und MacRae 2012). Die PAZ Domäne erkennt und bindet den Überhang aus 2 Nukleotiden am 3' Ende der zu prozessierenden miRNA (Lingel *et al.* 2003; Ma *et al.* 2004) und das 5' Ende der RNA wird in der MID Domäne gebunden (Ma *et al.* 2004; Frank *et al.* 2010). Die PIWI Domäne ist einer RNase H strukturell sehr ähnlich und ist in einigen AGO Proteinen befähigt, die RNA-Duplex in Gegenwart eines Mg^{2+} Ions zu spalten. Die Funktion der N-terminalen Domäne ist noch nicht ausreichend geklärt, wobei sie sehr wahrscheinlich die RNA-Duplex stützt (Kwak und Tomari 2012).

Zum Verständnis der durch AGO Proteine regulierten Genexpression werden in den nächsten Unterabschnitten die Zusammenstellung des RISCs, die Inhibition der Genexpression, Auswirkungen der AGO Protein Modifikation und die Lokalisation der AGO Proteine beschrieben.

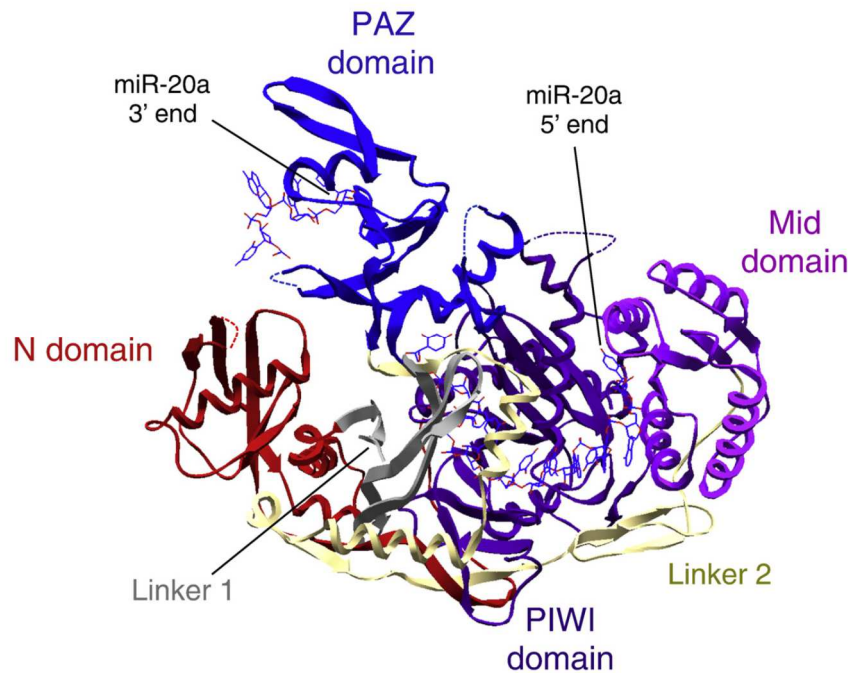


Abbildung I-4: Kristallstruktur von humanem AGO2 im Komplex mit miRNA-20a (verändert nach Gurtan und Sharp (2013)). AGO2 besitzt einen Multi-Domäne-Aufbau bestehend aus der Amino-terminal- (N, Rot), PAZ- (PIWI-Argonaute-Zwille, Hellblau), MID- (middle, Lila) und PIWI- (Dunkelblau) Domäne. Die N- und die PAZ-Domäne sind über den Linker 1 (L1, Grau) und die PAZ- und die MID-Domäne über den Linker 2 (L2, Silber) miteinander verbunden. Die gebundene miRNA-20a ist an ihren Enden dargestellt, wobei das 5' Ende an der MID-Domäne und das 3' Ende an der PAZ-Domäne lokalisiert ist. Die Kristallstruktur (Protein Daten Bank ID:4F3T) wurde von Elkayam et al. beschrieben (Elkayam *et al.* 2012).

7.1 ZUSAMMENSTELLUNG DES RISCs

Die Zusammenstellung des RISCs kann prinzipiell in zwei Schritte eingeteilt werden. Der erste Schritt stellt die RISC Beladung dar. Dabei wird die miRNA-miRNA* Duplex an das entsprechende AGO gebunden und der entstehende Komplex wird als pre-RISC bezeichnet. Der zweite Schritt kennzeichnet die Strang Dissoziation oder Strang Entwindung, bei der die miRNA-miRNA* Duplex Struktur aufgelöst wird indem einer der beiden Stränge den maturen RISC verlässt (Kawamata und Tomari 2010).

Die Selektion, welcher der beiden Stränge als *guide* Strang fungiert und somit den RISC komplettiert und welcher Strang als *passenger* Strang den RISC verlässt, erfolgt nicht zufällig. Ausschlaggebend hierfür ist die thermodynamische Stabilität der Duplex Enden. Diese asymmetrische Strang-Selektion wird auch als die „asymmetrische Regel“ bezeichnet, bei der derjenige Strang als *guide* Strang definiert wird, dessen 5' Ende auf der Seite der Doppelhelix lokalisiert ist, deren vier letzten Basenpaare die geringere thermodynamische Stabilität aufweisen (Schwarz *et al.* 2003).

Die Aufnahme von regulatorischen RNAs in den RISC ist ohne Unterstützung von weiteren Proteinen nur sehr eingeschränkt und ineffektiv möglich. Untersuchungen zeigten, dass isoliertes humanes Argonaut2 einzelsträngige RNA binden kann, nicht jedoch Doppelstrang-RNA (Yoda *et al.* 2010). Alle Proteine, die für einen funktionellen RISC notwendig sind, werden auch als pre-RISC oder als *RISC loading machinery* bezeichnet. In humanen Zellen bilden Dicer und TRBP den minimalen Komplex der nötig ist, um den RISC zu beladen. Die Anzahl der minimal nötigen Proteine ist dabei von der Art des Argonaut Proteins abhängig. Die Beladung des RISC ist ein energieabhängiger Prozess, bei dem die Energie für Konformationsänderungen im Argonaut aufgebracht werden muss, um diesen zur Aufnahme von doppelsträngiger RNA zu befähigen (Yoda *et al.* 2010).

Ein weiteres Protein, welches maßgeblich den RISC unterstützt, ist die Endonuklease C3PO. Dieses Protein hat einen asymmetrischen Aufbau aus sechs Translin und zwei TRAX Untereinheiten und ist befähigt RNA zu spalten. C3PO aktiviert den RISC durch die Degradation des *passenger* Strangs (Ye *et al.* 2011).

7.2 INHIBITION DER GENEXPRESSION DURCH DIE ARGONAUT PROTEINE ODER DEREN INTERAKTIONSPARTNER

Die molekularen Mechanismen der Genexpressionsregulation durch miRNAs sind derzeit noch nicht vollständig bekannt. Dabei ist vor allem völlig ungeklärt, welchen Nutzen die Zelle durch die Spezialisierung des RNA-spaltenden AGO2 hat und worin sich die übrigen drei verschiedenen AGO Proteine unterscheiden. Auffällig ist, dass mit Ausnahme des letalen AGO2 knock-out Mausmodells, die knock-out Mausmodelle der AGO1, AGO3 und AGO4 keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigen (Wang *et al.* 2012).

Die Inhibierung der Expression durch den RISC kann auf zwei verschiedenen Wegen geschehen. In den meisten Fällen benötigt eine miRNA nur eine kurze (Nukleotidposition 2 – 7 der miRNA), als *seed*-Sequenz bezeichnete komplementäre Übereinstimmung zur mRNA, um die Translation zu unterbinden (Bartel 2009). Bei einer vollständigen Watson Crick Basenpaarung zwischen der *guide* RNA und der Ziel-mRNA kann AGO2 selektiv die mRNA hydrolytisch spalten und somit die Translation des Gentranskriptes inhibieren. Dabei entstehen aus der mRNA zwei Fragmente. Ein 5'Fragment, welches eine freie 3'Hydroxylgruppe trägt, und ein 3'Fragment, welches eine 5'Phosphatgruppe besitzt (Martinez und Tuschl 2004; Schwarz *et al.* 2004). Die selektive Spaltung der mRNA erfolgt dabei an der Position, die sich direkt gegenüber zwischen der *guide* RNA Nukleotidposition 10 und 11 befindet (Liu *et al.* 2004; Tolia und Joshua-Tor 2007; Elkayam *et al.* 2012).

Alle Argonaut Proteine, die über die Fähigkeit verfügen RNA zu spalten, haben eine strukturelle Ähnlichkeit zur RNase H. Diese zeichnet sich durch ein Asp-Asp-Glu/Asp (D-D-E/D) Motiv aus, welches zweiwertige Metall Ionen für die Katalyse binden und bereitstellen kann (Nowotny *et al.* 2005). Die

PIWI Domäne zeigt ein sehr ähnliches Motiv bestehend aus Asp-Glu-Asp-His/Asp (D-E-D-H/D), welches für die RNA Spaltung verantwortlich ist (Miyoshi *et al.* 2005; Nakanishi *et al.* 2012). Das D-E-D-H/D Motiv ist zwar essentiell für Argonaut um RNA zu katalytisch zu spalten, jedoch ist es alleine nicht dafür ausreichend. Das humane AGO3 enthält beispielsweise, genau wie das zur RNA Hydrolyse fähige AGO2 das D-E-D-H/D Motiv, ist jedoch im Gegensatz dazu nicht in der Lage RNA zu spalten. Mitverantwortlich hierfür ist die N-terminale Domäne der Argonaut Proteine, da bei spezifischen Bindungen von Interaktionspartnern Konformationsänderungen ausgelöst werden, die für eine hydrolytische Aktivität sorgen (Hauptmann *et al.* 2013).

Sind die Sequenzen der beiden RNA Stränge jedoch nicht vollständig komplementär, benötigen die Argonaut Proteine Interaktionspartner zur Genexpressionsunterdrückung, wie z.B. die GW182 Proteine. Die Familie der GW182 Proteine ist nach ihrem Molekulargewicht von 182 kDa und dem häufig wiederholenden Auftreten der Aminosäuren Glycin (G) und Tryptophan (W) im N-Terminus benannt.

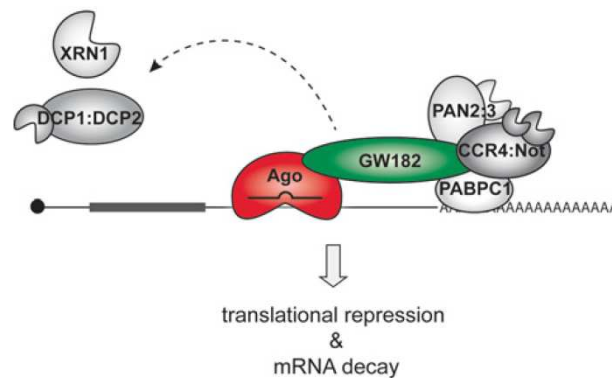


Abbildung I-5: Mechanismus des GW182 basierten Inhibition des Gentranskripts (verändert nach Pfaff und Meister (2013)). Die mature miRNA führt das AGO Protein zu der sequenzkomplementären mRNA. Die GW182 Proteine werden von AGO rekrutiert und sind für alle folgenden Prozesse der Genexpressionshemmung verantwortlich. Sie ermöglichen die Interaktion von poly(A)-Bindepoteinen (PABPC1) und den Deadenylasen PAN2/3 oder CCR4/NOT. Aufgrund der Deadenylierung der mRNA kommt es anschließend zur Entfernung der 5'Kappe der mRNA durch DCP1/2 und zuletzt zur vollständigen Degradation durch die 5'-3' Exonuklease XRN1.

Es konnte bereits eine Interaktion der humanen GW182 Isoformen TNRC6A, TNRC6B und TNRC6C mit allen vier Argonaut Proteinen (AGO1-AGO4) nachgewiesen werden (Lazaretti *et al.* 2009). Dabei erfolgt die AGO Bindung über die G-W-Wiederholungen, die auch als AGO-Hook (AGO-Haken) bezeichnet werden. Das C-terminale Ende wird als *silencing* Domäne bezeichnet, da sie AGO unabhängig befähigt ist die mRNA zu spalten (Zipprich *et al.* 2009). Die *silencing* Domäne enthält zwei Bindestellen für das zytoplasmatische poly(A)-Bindepotein (PABPC), eine für eine direkte PABPC Bindung über ein PABPC-Interaktionsmotiv 2 (PAM2) und ein weiteres indirektes PABPC Bindemotiv

näher am C-Terminus. Zudem sind Tryptophan-Motive bestehend aus G/S/TW oder WG/S/T am C- und N- Terminus der GW182 Proteine verantwortlich für die Bindung von CCR4-Not oder PAN2-PAN3. Diese Komplexe sind für die Deadenylierung der mRNA zuständig (Abbildung I-5) (Chekulaeva *et al.* 2011).

7.3 ARGONAUT MODIFIKATIONEN UND DEREN AUSWIRKUNGEN

Wie die meisten Proteine können AGOs auch post-transkriptional modifiziert werden. Eine Übersicht über bisher beschriebene Modifikationen sind in Abbildung I-6 zu sehen.

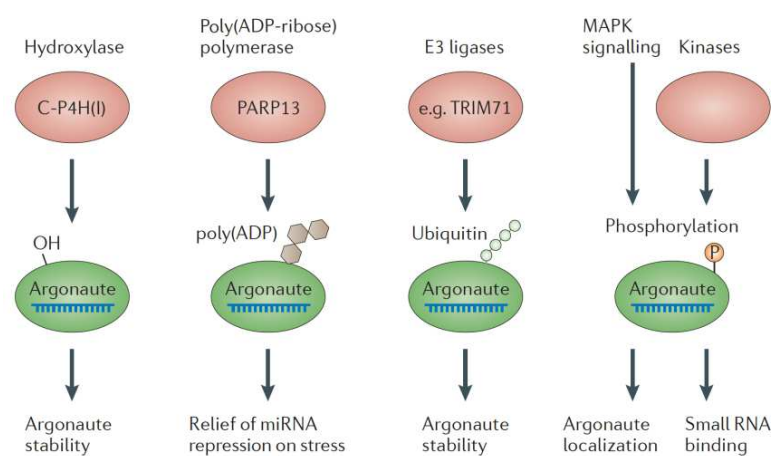


Abbildung I-6: Posttranslationale Modifikationen der Argonaut Proteine (verändert nach Meister (2013)). Durch die Typ I Collagen prolyl-4-hydroxylase (C-P4H(I)) können die Argonaut Proteine hydroxyliert werden, was die Argonaut Stabilität erhöht. Zu einer Stabilitätserhöhung kommt es ebenfalls durch eine Poly-Ubiquitinierung durch die E3 Ligase Trim71. Auch eine poly(ADP-Ribose)-Modifikation von AGO durch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase PARP13 ist möglich und trägt zu einer verstärkten miRNA Repression bei zellulärem Stress bei. Phosphorylierungen von AGO2 sind für die richtige Lokalisation und für ein effizientes Binden der miRNA an AGO erforderlich.

Eine Hydroxylierung von AGO2 am Prolin 700 (P700) erhöht dessen Stabilität. Durch *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass AGO2 und AGO4 durch die C-P4H(I) Hydroxylase etwas effizienter hydroxyliert werden können als AGO1 und AGO3 (Qi *et al.* 2008).

Poly(ADP-Ribose) ist ein Makromolekül im Nukleus, welches für die Regulation der Transkription, von Chromosomenstrukturen und von Reparaturmechanismen nach DNA Schädigungen verwendet wird. Durch Stress in der Zelle kommt es zu einer vermehrten Bildung von Stress Granula im Zytoplasma der Zelle. Dabei kann auch eine vermehrte Anzahl von poly(ADP-Ribose)-modifizierten AGO1 bis AGO4 Proteinen nachgewiesen werden, deren Funktion in der erleichterten mRNA Repression liegt (Leung *et al.* 2011).

Trim71 oder das homologe *lin-41* sind E3 Ligasen, die für die Ubiquitinierung von AGO verantwortlich sind. Überexpression oder Hemmung von *lin-41* führt zu einer zu LIN41 inversen AGO2 Konzentration, was auf eine Regulation des AGO Umsatzes schließen lässt. Durch ihren starken Einfluss auf AGO kann *lin-41* als Inhibitor des miRNA Systems fungieren (Rybak *et al.* 2009).

Durch Mutationsstudien konnte gezeigt werden, dass eine Substitutionsmutation des phosphorylierbaren Serins 387 im AGO2 zu Alanin zu einer Verminderung der AGO2 Konzentration an den *processing bodies* (*P-bodies*) führt und somit für die AGO2 Lokalisation verantwortlich ist (Rudel und Meister 2008). Durch Ausübung von Stress auf Zellen kommt es über den p38 MAPK Signalweg zu einer Steigerung der AGO2 Phosphorylierung (Zeng *et al.* 2008).

7.4 P-BODIES

Die *P-Bodies* (*mRNA processing bodies*) oder GW-Bodies sind abgegrenzte zytoplasmatische Aggregate in eukaryotischen Zellen, die nicht von einer Lipid-Doppelmembran begrenzt sind und einen Durchmesser von 100-300 nm aufweisen (Yang *et al.* 2004). Sie wurden 1997 von Bashkirov *et al.* erstmalig im Zusammenhang mit der 5'-3' Exonuklease XRN1 beschrieben (Bashkirov *et al.* 1997). Heute ist bekannt, dass *P-Bodies* neben den AGO Proteinen noch eine Vielzahl an weiteren Proteinen enthalten, die an mehreren mRNA basieren Prozessen beteiligt sind, z.B. miRNA bindende Proteine (eIF4E), Inhibierung der Translation (Rck/p54, eIF4ET, and CPEB1), Deadenylierung der mRNA (Caf1 and Ccr4), Entfernung der 5'Cap-Struktur der mRNA (Dcp1/2 and Lsm1-7), mRNA 5'-3'Degradation (Xrn1), und miRNA induzierter Abbau der mRNA (AGO1-4 und GW182) (Eulalio *et al.* 2007; Zheng *et al.* 2011).

Die AGO2 Konzentration ist in den *P-Bodies* um das 10fache höher als im restlichen Zytoplasma. Wird jedoch in die AGO2 Konzentrationsbestimmung das Volumen der *P-Bodies* und des Zytoplasmas mit einkalkuliert, befinden sich weniger als 1 % aller AGO2 Proteine in den *P-Bodies* (Leung und Sharp 2013). Für ihre Funktion der Genexpressionsunterdrückung sind die Argonaut Proteine nicht auf eine Lokalisation in den *P-Bodies* angewiesen, daher wird die Funktion der *P-Bodies* im Zusammenhang mit dem RNAi-System noch kontrovers diskutiert (Jakymiw *et al.* 2007; Leung und Sharp 2013). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass GW182 (GW182Δ1, Aminosäure 1–498) und AGO2 (PIWI Domäne, Aminosäure 482–869) Mutanten die Formierung der *P-Bodies* erheblich reduzieren (Jakymiw *et al.* 2005).

Um die Rolle der AGO Proteine im malignen Melanom zu verstehen, ist es von Bedeutung das Regulationsnetzwerk der miRNAs im malignen Melanom zu charakterisieren. Im letzten Abschnitt der Einleitung wird daher die Rolle der miRNAs in der Progression des malignen Melanoms beschrieben.

8 MIRNAS IN DER PROGRESSION DES MALIGNEN MELANOMS

Für die Transformation von Melanozyten sind vor allem Mutationen verantwortlich, die entweder Gene aktivieren die die Tumorbildung fördern (Onkogene), oder aber Gene inaktivieren, die die Tumorbildung unterdrücken (Tumorsuppressorgene). Diese Mutationen können rein zufällig auftreten oder durch äußere Einflüsse induziert werden. Der einzig derzeit bekannte Umwelteinfluss, der für eine erhöhte Mutationsrate im Melanom nachgewiesen wurde, ist die Strahlenbelastung durch UV Licht. Jedoch ist der Zusammenhang von UV Licht zum Melanom sehr komplex und scheinbar durch weitere Faktoren beeinflusst. So zeigen z.B. Menschen die im Freien arbeiten eine niedrigere Inzidenz für eine Melanomerkrankung, als Menschen die in einem Gebäude arbeiten (Glud und Gniadecki 2013). Einer dieser beeinflussenden Faktoren könnten miRNAs darstellen, deren Fehlregulation im malignen Melanom (Kunz 2013; Völler *et al.* 2013), aber auch in anderen Tumoren (Finch *et al.* 2014; Serpico *et al.* 2014), nachgewiesen wurden. Dabei können diese fehlregulierten miRNAs die Expression von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen in erheblichem Maße beeinflussen und so ebenfalls für eine Melanozytentransformation verantwortlich sein. Die durch die miRNAs fehlregulierten Schlüsselproteine sind beispielsweise für die Zellkommunikation (Rezeptorproteine), die Reizweiterleitung (Signalwegproteine) oder für die Genexpression (Transkriptionsfaktoren) verantwortlich (Abbildung I-7).

Der aktuelle Wissensstand zur Verflechtung von melanomrelevanten miRNAs und ihren Zielgenen wurde in einer zusammenfassenden Studie begleitend zu dieser Arbeit veröffentlicht (Völler *et al.* 2013). Einige Beispiele aus dieser Studie zeigen die miRNA basierte Fehlregulation von melanomrelevanten Schlüsselproteinen und deren phänotypischen Auswirkungen auf die Melanomzelle auf.

8.1 MIRNAS ALS REGULATOREN VON REZEPTORPROTEINEN

Die miRNA-211 ist in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten stark exprimiert. Dies hat zur Folge, dass mehrere dadurch direkt regulierte Rezeptoren im Melanom nur eine schwache Expression zeigen. Hierzu zählen der Rezeptor KIT, *insulin-like growth factor 2 rezeptor* (IGF2R) und *transforming growth factor β rezeptor 2* (TGFB2) (Igoucheva und Alexeev 2009). Die starke miRNA-211 Expression steigert das invasive Potential der Melanomzellen (Levy *et al.* 2010). Die Ursache für die starke Integrin $\beta 3$ Expression im Melanom ist begründet durch die schwache Expression der Integrin $\beta 3$ regulierenden miRNA-let7a (Muller und Bosserhoff 2008). Der *hepatocyte growth factor* (HGF) Rezeptor c-MET ist im Melanom ebenfalls stark exprimiert aufgrund der geringen Konzentration von mehreren c-MET regulierenden miRNAs. Dazu gehören die miRNAs miRNA-34b,

miRNA-34c und miRNA-199a* (Migliore *et al.* 2008). Die geringe Expression des Rezeptors Notch4 ist eine direkte Konsequenz der im Melanom hochregulierten miRNA-302a (Costa *et al.* 2009). Die miRNA Regulation ist jedoch nicht nur auf die Rezeptoren begrenzt, sondern kann auch die Liganden der Rezeptoren betreffen. miRNA-34a reguliert *ULBP2*, einen Liganden der natürlichen Killerzellen (NK, *natural killer cells*) und der zytotoxischen T-Lymphozyten Immunrezeptoren *NKG2L*. In den Melanozyten ist die miRNA-34a stärker exprimiert als im Melanom, was einen Zellzyklusarrest und eine vermehrte Apoptose zur Folge hat (Heinemann *et al.* 2012).

8.2 MIRNAS ALS REGULATOREN VON SIGNALWEGPROTEINEN

Viele Signalwege werden durch fehlregulierte miRNAs im Melanom beeinflusst. Ein Zielgen der miRNA-let-7 ist die 3'UTR des Gentranskripts vom *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS). KRAS gehört mit HRAS und NRAS zur Familie der RAS Proteine, welche an den Signalwegen MEK/ERK (*mitogen-activated protein kinase / extracellular regulated kinase*), PI3K (*phosphatidylinositide 3-kinase*) und RalGDS (*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*) beteiligt sind. Die geringe miRNA-let-7a Expression im Melanom verursacht eine Fehlregulation von KRAS. Die Änderung der KRAS Konzentration hat einen Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und den Zelltod. Gleichzeitig ist KRAS ein Onkogen, welches sehr häufig von Mutationen betroffen ist die vor allem in der miRNA-let7 Binderegion lokalisiert sind. Aus diesem Grund kommt es nicht bei allen KRAS-Varianten zu einer Regulation durch die miRNA-let7 (Kundu *et al.* 2012).

Cyclin D1 ist ein direktes Zielgen der miRNA-193b, welche im metastasierenden Melanom eine stärkere Expression zeigt als im benignen Nävus (Chen *et al.* 2010). Eine weitere Cyclin D1 regulierende miRNA ist die miRNA-let-7b, die ebenfalls im Melanom stark reduziert vorliegt. Überexpressionsversuche dieser miRNAs führten zu einer verringerten Proliferation und zu einem Zellzyklusstopp in der G1 Phase. Diese Phänomene wurden auch für einen Cyclin D1 Verlust beschrieben (Schultz *et al.* 2008).

Ein Tumorsuppressor des PI3K/AKT Signalweges ist PTEN (Carracedo und Pandolfi 2008), welches im Melanom reduziert vorliegt. Verantwortlich für die PTEN Reduktion sind die miRNAs miRNA-25, miRNA-92a, miRNA-181a und miRNA-200b. Diese zeigen alle eine verstärkte Expression in Melanomzelllinien und fördern die Progression und Metastasierung des Melanoms (Karreth *et al.* 2011).

Der Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitor p27^{kip1} wird direkt durch die miRNA-211 reguliert. Aufgrund der starken Expressionserhöhung der miRNA-211 im Melanom ist die p27^{kip1} Expression reduziert. In Folge einer Verringerung der miRNA-211 Abundanz kommt es in Melanomzellen zu einem Wachstumsstopp. Die Repression der miRNA-211 kann durch eine Behandlung der Zellen mit

Interferon (IFN) erreicht werden. Dieses induziert die Typ I 3'-5'-Exoribonuklease hPNPase^{old-35} (humane Phosphorylase), welche spezifische mRNAs und kleine regulatorische RNAs, wie die miRNA-211, degradiert (Das *et al.* 2010).

8.3 MIRNAS ALS REGULATOREN VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

Der Transkriptionsfaktor MITF wird durch mehrere miRNAs reguliert. Im Melanom weisen die beiden MITF regulierenden miRNAs, miRNA-148 und miRNA-182, eine gesteigerte Expression auf, wohingegen die MITF regulierende miRNA-137 in ihrer Expression reduziert ist (Bemis *et al.* 2008; Haflidadottir *et al.* 2010; Völler *et al.* 2013). MITF kontrolliert unter anderem die Expression der miRNA-211. Das Zielgen der miRNA-211 ist der Transkriptionsfaktor BRN2 (auch bezeichnet als NOCT3 oder POU3F2), der für die MITF Expression verantwortlich ist. Die miRNA-211 basierte Steigerung der BRN2 Expression ist daher Ursache der MITF Repression und führt zu einem gesteigerten metastatischen Potential der Melanomzellen (Boyle *et al.* 2011; Berlin *et al.* 2012).

Auch die FOXO3 Expression ist, analog der MITF Expression, von der miRNA-182 abhängig (Segura *et al.* 2009). Die miRNA-9 reguliert den Transkriptionsfaktor Snail1 indirekt durch die Bindung an die 3'UTR des Transkriptionsfaktors NF κ B1 (*nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B-cells*) welcher Snail reguliert (Liu *et al.* 2012). Somit ist die im Melanom schwach exprimierte miRNA-9 Ursache der gesteigerten Snail Expression. Auch die miRNA-155 weist eine schwächere Expression in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten auf und verursacht eine Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors SKI. Die miRNA-155 reguliert SKI durch direktes Binden in der 3'UTR (Levati *et al.*, 2011). Die beiden Transkriptionsfaktoren HOX-C8 und HOX-B7 sind durch die miRNA-196a reguliert und zeigen im Melanom eine gesteigerte Expression gegenüber Melanozyten (Braig *et al.* 2010; Mueller und Bosserhoff 2011).

Die Transkriptionsfaktoren E2F1, E2F3 und E2F5 aus der E2F-Familie haben Cyclin A, Cyclin E, c-Myc, SIRT1 (sirtuin 1) und RB (Retinoblastoma Protein) als Zielgene. E2F1 und E2F5 werden durch die miRNA-205 und E2F3 durch die miRNA-203 reguliert. Die Expression dieser miRNAs ist im Melanom stark reduziert und diese zeigen daher eine Tumorsuppressorfunktion (Noguchi *et al.* 2012). Die miRNA-205 reguliert zusätzlich noch AKT, welches die Proliferation beeinflusst und die Apoptose durch eine Inaktivierung von pro-apoptotischen Faktoren wie BAD (*BCL2-associated agonist of cell death*) und Caspase-9 inhibiert (Dar *et al.* 2011).

Zu der Familie der AP2 Transkriptionsfaktoren gehört das TEAP2C, welches durch die miRNA-214 direkt reguliert wird. Während der Progression des Melanoms nimmt die TEAP2C Expression ab und es kommt zu einem Anstieg des malignen Potentials der Zelle (Penna *et al.* 2011).

Die RUNX3 Reduktion ist Folge einer gesteigerten miRNA-532 Expression, die den Transkriptionsfaktor direkt reguliert (Kitago *et al.* 2009).

Die cJun Expression wird von miRNA-125b durch eine Bindung in der kodierenden Sequenz (CDS) der cJun mRNA reguliert. Die gesteigerte cJun Expression im Melanom wird durch den Verlust der miRNA-125b Expression verursacht (Kappelmann *et al.* 2013).

Die miRNA-137 bindet an die 3'UTR von CtBP1 (C-terminales-Bindeprotein 1). Dieses Protein ist ein transkriptionaler Korepressor von Tumorsuppressorgenen wie E-Cadherin, BAX (BCL2-assoziiertes X Protein), PTEN und p53. Die Progression des Melanoms wird gefördert durch die erhöhte Expression der Tumorsuppressorgene, was unter anderem an der erniedrigten miRNA-137 Expression liegt (Deng *et al.* 2011).

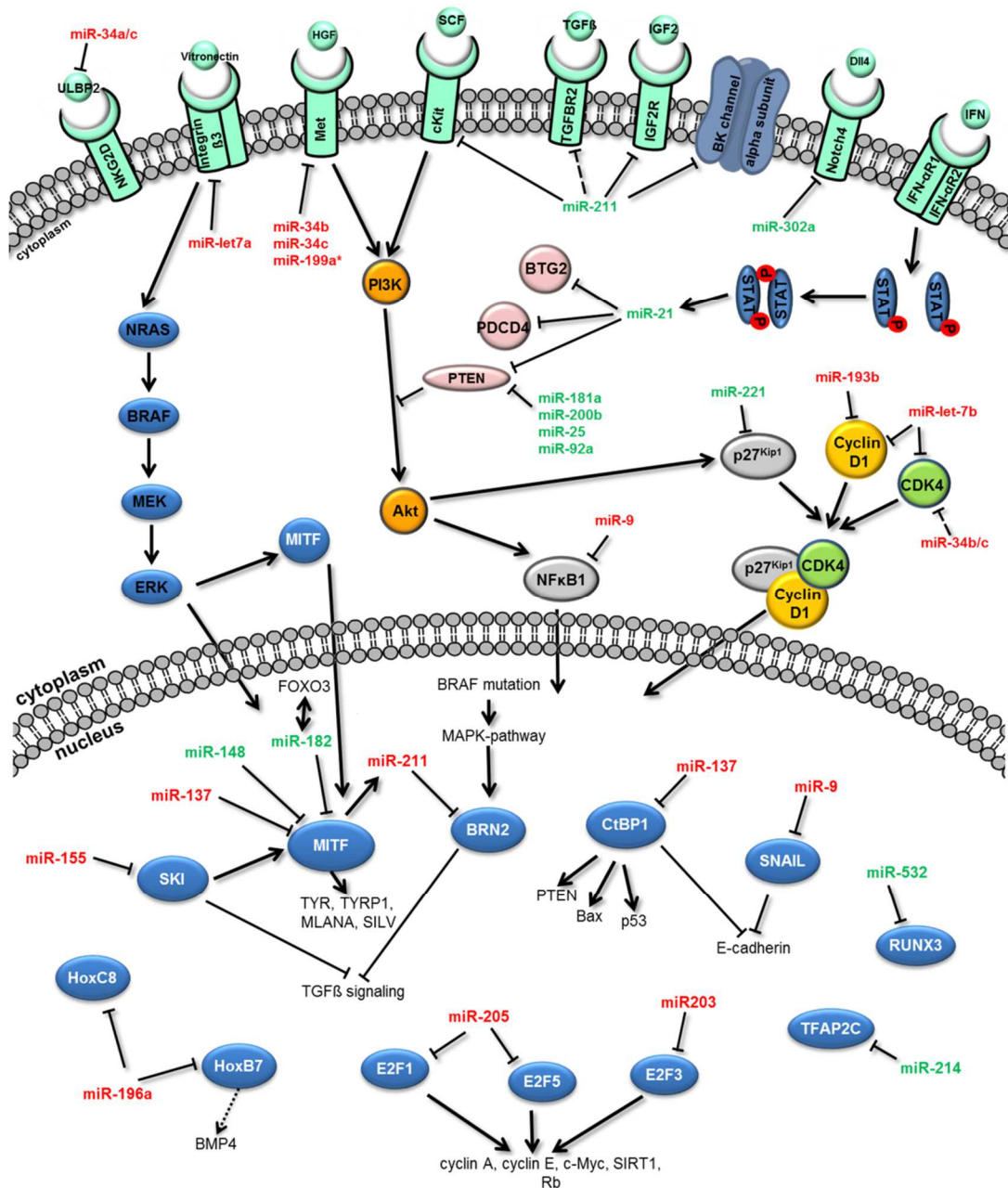


Abbildung I-7: MiRNAs die im malignen Melanom für eine Fehlregulation ihrer Zielgene verantwortlich sind (verändert nach Völler *et al.* (2013)). Netzwerk von Rezeptoren, Signalwegen und Transkriptionsfaktoren, die durch miRNAs im Melanom reguliert werden. MiRNAs die im Melanom stärker exprimiert werden als in Melanozyten sind grün dargestellt; bei den rot dargestellten miRNAs ist die Expression in den Melanozyten stärker.

II ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Das Verständnis über die veränderten molekularen Prozesse in Krebszellen ist der erste Schritt auf der Suche nach neuen Therapieansätzen. MiRNAs erfüllen eine wichtige Aufgabe bei der Steuerung grundlegender biologischer Prozesse wie Entwicklung, Zelldifferenzierung, Proliferation und Apoptose. In den letzten Jahren entwickelte sich die Erkenntnis, dass miRNAs auch an der Entstehung menschlicher Krankheiten wie Krebs oder Stoffwechselstörungen beteiligt sind. Auch in Bezug auf das maligne Melanom haben viele Studien einen Zusammenhang zwischen der Progression des Tumors und der Fehlregulation von miRNAs gezeigt. Es wurde dabei jedoch zumeist eine vermehrte oder verminderte miRNA Expression auf Basis einer veränderten miRNA Transkription als Ursache für die Modulation der Zielgene angenommen.

Ziel dieser Arbeit war es, die miRNA Prozessierung als mögliche Ursache für die fehlerhafte miRNA Expression im Melanom zu untersuchen und gegebenenfalls Konsequenzen für die Krebszelle genauer zu charakterisieren. Dabei wurde der Schwerpunkt auf die Argonaut (AGO) Proteine gelegt, da diese Proteine das zentrale Element in der miRNA Prozessierung darstellen. Die generelle Funktion der AGO Proteine in der miRNA Prozessierung ist weitestgehend beschrieben, jedoch wurde noch in keiner veröffentlichten Studie eine spezifische Modulation der AGO Proteine im malignen Melanom nachgewiesen.

III ERGEBNISSE

1 DIE GENEXPRESSION DER ARGONAUT PROTEINE

Viele Proteine sind für die Prozessierung von kurzen, regulatorischen RNAs verantwortlich, wie z.B. Drosha, Pasha oder Dicer (Wilson und Doudna 2013; Devasthanam und Tomasi 2014). Eine Gruppe von Prozessierungsproteinen stellt jedoch das direkte Bindeglied zwischen den muren miRNAs, den piRNAs oder den siRNAs mit dem zu regulierenden Gentranskript dar: die Proteine der Argonaut Familie. Um zu analysieren, ob die miRNA Prozessierungsproteine im malignen Melanom evtl. einer Fehlregulation unterliegen, wurde zunächst die Expression der AGO Proteine bestimmt.

1.1.1 DIE GENEXPRESSION DER ARGONAUT PROTEINE IM MALIGNEN MELANOM UND ANDEREN TUMOREN

Abbildung III-1 zeigt die relative Genexpression der vier Argonaut Proteine (AGO1-AGO4) in Melanozyten von drei verschiedenen Spendern, Melanomzelllinien aus Primärtumor (Mel Ei, Mel Ho und Mel Wei) bzw. Metastasen (Mel Ju, Mel Im, SkMel28 und Hmb2) und anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien. Als „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien wurden SW1353 (humane Chondrosarkom Zelllinie), Jurkat (humane Leukämie Zelllinie), CaCo2 (humane Colon Adenokarzinom Zelllinie), MCF7 (Michigan Cancer Foundation-7, humane Brust Karzinom Zelllinie), PLC (humane Hepatom Zelllinie), Hep3b (humane Hepatom Zelllinie), HepG2 (humane Hepatom Zelllinie) und HeLa (humane Zervixkarzinom Zelllinie) ausgewählt.

Generell ist die AGO mRNA Expression in den Melanomzelllinien der Expressionsstärke der drei analysierten NHEMs entsprechend. Auch die Zelllinien SW1353 und HeLa weisen eine AGO Genexpression auf, die mit der Expression der Melanomzellen vergleichbar ist. Die anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien hingegen, zeigen eine sehr heterogene AGO Genexpression.

Die AGO1 Genexpression ist in allen Zelllinien mit Ausnahme von PLC, die eine fünffache AGO1 Expressionserhöhung bezogen auf NHEM I aufweist, sehr einheitlich.

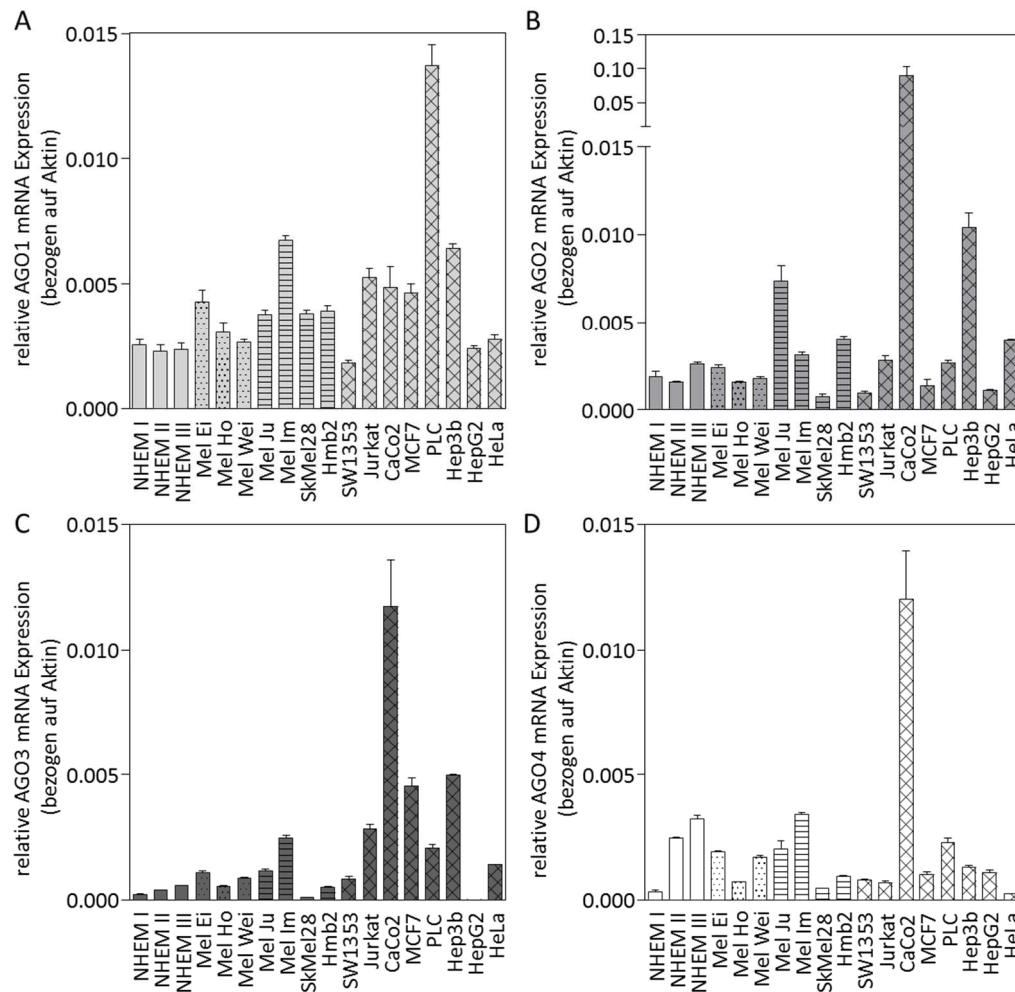


Abbildung III-1: Die Genexpression der vier AGO Proteine im Melanom und anderen „nicht-Melanom“ Tumoren.

Dargestellt sind die relativen Genexpressionen von (A) AGO1, (B) AGO2, (C) AGO3 und (D) AGO4 in NHEMs von drei verschiedenen Spendern, in Melanomzelllinien aus Primärtumoren (Mel Ei, Mel Ho und Mel Wei) und Metastasen (Mel Ju, Mel Im, SkMel28 und Hmb2) und in verschiedenen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien (SW1353, Jurkat, CaCo2, MCF7, PLC, Hep3b, HepG2 und HeLa).

CaCo2 und Hep3b besitzen eine sehr starke AGO2 Expressionserhöhung (50- bzw. 6- fache AGO2 Expressionsstärke bezogen auf NHEM I), die Melanomzelllinie Mel Ju hingegen zeigt nur eine leichte AGO2 Expressionserhöhung (vierfache AGO2 Expressionsstärke bezogen auf NHEM I) im Vergleich zu den anderen Melanomzelllinien. Die stärkste AGO3 Expression demonstriert CaCo2 mit einer 70-fachen Expressionserhöhung im Vergleich zu NHEM I. Auch die Zelllinien Hep3b und MCF7 weisen eine gesteigerte AGO3 Expression auf (20- bzw. 19-fache AGO3 Expressionsstärke bezogen auf NHEM I), die jedoch nicht so hoch ausfällt wie bei CaCo2. Im starken Kontrast dazu zeigt die Zelllinie HepG2 keine AGO3 Genexpression. Die AGO4 Expression der NHEMs der drei verschiedenen Spender ist nicht einheitlich und weist beispielsweise bei Spender III eine um das 10-fach höhere AGO4 Expression auf als bei Spender I. Auch bei der AGO4 Genexpression zeigt

CaCo2 eine erhebliche Expressionssteigerung (40-fache AGO4 Expressionsstärke bezogen auf NHEM I) im Vergleich zu den anderen Zelllinien.

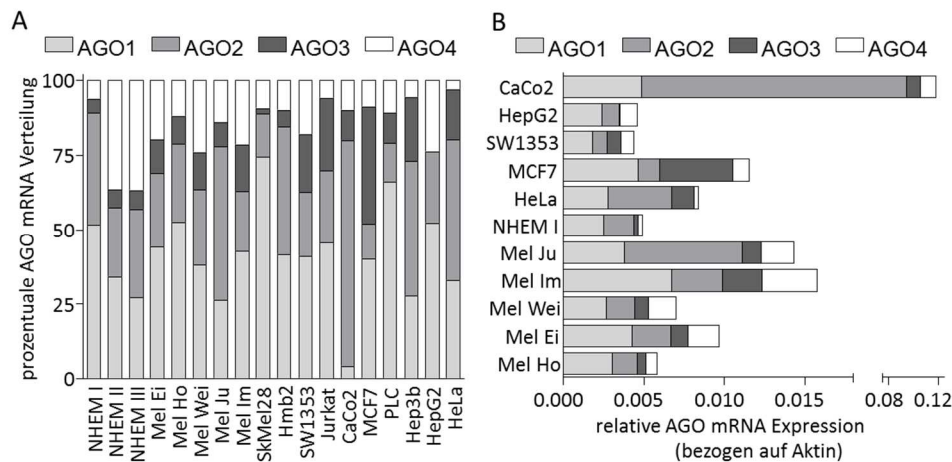


Abbildung III-2: Die Genexpressionsverteilung der vier Argonaut Proteine im Melanom und anderen Tumoren. (A) Prozentuale AGO mRNA Verteilung in NHEMs von drei verschiedenen Spendern, in Melanomzelllinien aus Primärtumoren (Mel Ei, Mel Ho und Mel Wei) und Metastasen (Mel Ju, Mel Im, SkMel28 und Hmb2) und in verschiedenen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien (SW1353, Jurkat, CaCo2, MCF7, PLC, Hep3b, HepG2 und HeLa). (B) Gesamte AGO mRNA Expression in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien CaCo2, HepG2, SW1353, MCF7 und HeLa und in NHEM von Spender I sowie in den Melanomzelllinien Mel Ju, Mel Im, Mel Wei, Mel Ei und Mel Ho.

In Abbildung III-2 ist ersichtlich, dass mit Ausnahme von SkMel28 die AGO Genexpressionsverteilung auf die vier AGOs in den Melanomzelllinien sehr vergleichbar ausfällt. Auf AGO1 entfallen 37 % bis 52 %, auf AGO2 19 % bis 26 %, auf AGO3 9 % bis 19 % und auf AGO4 12 % bis 24 %. In der Zelllinie SkMel28 ist die AGO1 mRNA Expression mit 74 % im Vergleich zu den anderen Melanomzelllinien deutlich erhöht.

In der AGO Genexpressionsverteilung der NHEMs entfallen 27 % bis 51 % auf AGO1, 23 % bis 30 % auf AGO2, 5 % bis 6 % auf AGO3 und 6 % bis 37 % auf AGO4. Eine große Varianz ist in der Verteilung von AGO1 und AGO4 erkennbar, wohingegen die AGO2 und AGO3 Verteilung sehr konstant zwischen den NHEMs der verschiedenen Spender ist.

Die „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien zeigen kein einheitliches Verteilungsmuster. CaCo2 beispielsweise zeigt einen 70 %igen Genexpressionsanteil von AGO2, wohingegen PLC einen 65 %igen Anteil von AGO1 aufweist. Im Gegensatz zu MCF7, die den höchsten AGO3 Genexpressionsanteil von ca. 40 % hat, zeigt HepG2 keine AGO3 Genexpression.

In Abbildung III-2 ist die Gesamtmenge an relativer AGO mRNA Expression von einigen Zelllinien dargestellt. Mit Ausnahme von CaCo2 weisen alle Zelllinien eine homogene Gesamtmenge an relativer AGO mRNA Expression auf. Im Vergleich zu allen anderen Zelllinien ist die AGO mRNA

Expression der CaCo2 Zelllinie erheblich gesteigert (27-fache AGO mRNA Expressionsstärke bezogen auf NHEM I). HepG2 und SW1353 besitzen eine vergleichbare AGO mRNA Expression wie die Melanomzelllinien Mel Wei und Mel Ho als auch die NHEMs des Spenders I. Dagegen ist die relative AGO mRNA Expression in MCF7 und HeLa Zellen und in den Melanomzelllinien Mel Ju, Mel Im und Mel Ei leicht erhöht.

1.1.2 DIE GENEXPRESSION DER ARGONAUT PROTEINE IM GESUNDEN GEWEBE

Die Analyse der jeweiligen AGO Genexpressionen ergab in den Melanomzelllinien ein weitestgehend einheitliches Verteilungsbild, wohingegen die Verteilung in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien eine sehr heterogene AGO Verteilung zeigt (siehe 1.1.1). Daher stellt sich die Frage, wie sich die relative mRNA Expression und die prozentuale Verteilung der AGOs in gesunden Geweben in Bezug auf NHEMs darstellen.

In Abbildung III-3 sind die relativen Genexpressionen von AGO1 bis AGO4 in den gesunden Geweben der Haut, Herz, Niere, Knochenmark, Darm, Thymus, Uterus, Trachea, Muskel, Leber, fetaler Leber, Hirn und fetalem Hirn im Vergleich zu Melanozyten aus drei verschiedenen Spendern dargestellt. Es ist eine gesteigerte Expression aller AGOs im Gewebe vom fetalen Hirn und der Trachea und eine vergleichbare Expression in den Geweben von Herz, Darm und Muskel bezogen auf die Melanozyten erkennbar. Die Haut, die neben den Melanozyten noch andere Zelltypen beinhaltet, zeigt ebenfalls keine Änderung der Genexpression aller AGOs gegenüber den NHEMs. Herz und Niere weisen zudem eine moderat höhere AGO1 Expression (1,5 fach bzw. 2,9 fach bezogen auf NHEM I), fetale Leber eine höhere AGO2 Expression (7 fach bezogen auf NHEM I) und Thymus, Uterus und Hirn eine erhöhte AGO3 Expression (14 fach, 20 fach und 20 fach bezogen auf NHEM I) im Vergleich zu NHEMs auf.

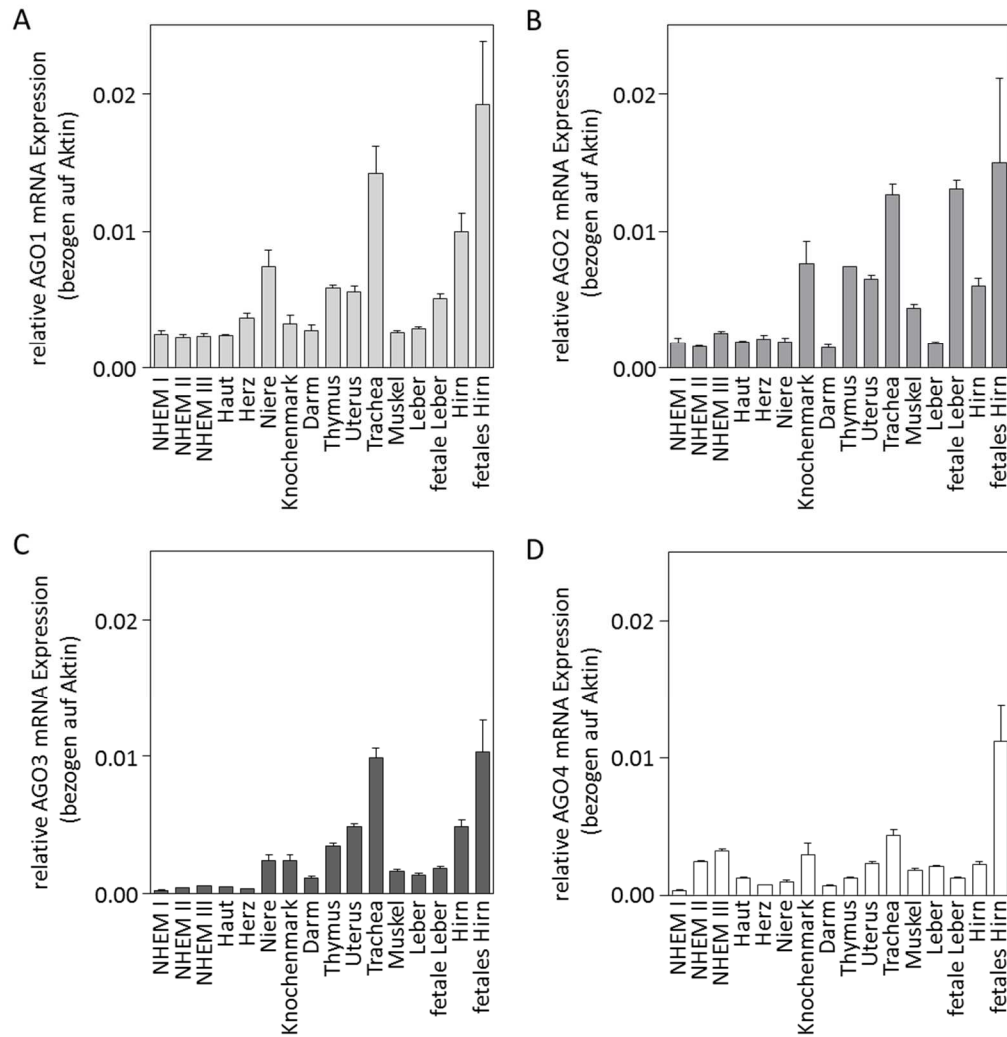


Abbildung III-3: Genexpressionsanalysen der vier AGOs in gesunden Geweben im Vergleich zu Melanozyten.

Dargestellt sind die relativen (A) AGO1, (B) AGO2, (C) AGO3 und (D) AGO4 Genexpressionen in den gesunden Geweben Haut, Herz, Niere, Knochenmark, Darm, Thymus, Uterus, Trachea, Muskel, Leber, fetaler Leber, Hirn und fetalem Hirn im Vergleich zu Melanozyten aus drei verschiedenen Spendern.

Die zur Genexpression zugehörige prozentuale Verteilung der Argonaut Genexpressions-Häufigkeiten ist in Abbildung III-4 dargestellt. Die AGO Genexpressionsverteilung in den NHEMs von verschiedenen Spendern wurde bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben (siehe 1.1.1). AGO1 ist das am stärksten vertretende AGO in den Geweben von NHEMs, Haut, Herz, Niere, Darm und Hirn, wohingegen die AGO2 mRNA Expression in den Geweben von Thymus, Muskel, Knochenmark und fetaler Leber prominenter ist. Mit der Ausnahme von Herz, Leber und Haut, welche im Vergleich zu den NHEMs eine gleich starke AGO3 mRNA Expression besitzen, zeigen die anderen Gewebe eine deutliche Variation in der AGO3 Expressionsverteilung, die zwischen 8,6 % und 25 % liegt. Einen hohen AGO4 Anteil haben die Gewebe aus fetalem Hirn, Muskel, Leber,

Haut und Knochenmark, der zwischen 17 % und 28 % liegt. Die übrigen Gewebe hingegen kommen lediglich auf einen AGO4 Anteil zwischen 7 % und 12 %.

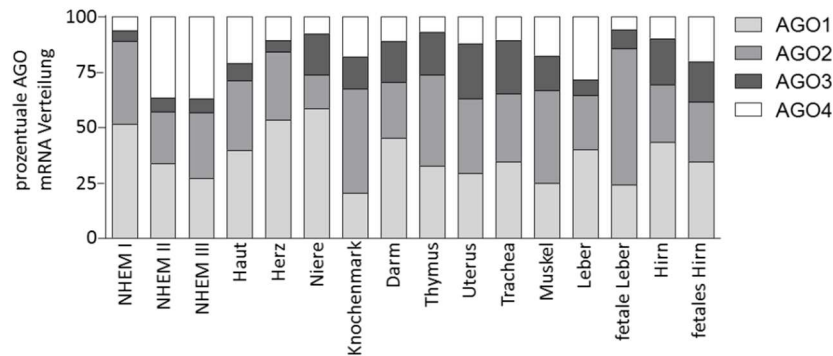


Abbildung III-4: Genexpressionsverteilung der vier AGOs in gesunden Geweben im Vergleich zu Melanozyten.

Prozentuale mRNA Genexpressionsverteilung der vier AGOs pro Gewebe in den gesunden Geweben Haut, Herz, Niere, Knochenmark, Darm, Thymus, Uterus, Trachea, Muskel, Leber, fetaler Leber, Hirn und fetalem Hirn im Vergleich zu Melanozyten aus drei verschiedenen Spendern.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieses Kapitels, dass jedes Gewebe und auch die verschiedenen Tumore ein individuelles mRNA Expressionsmuster für AGO1 bis AGO4 aufweist. Jedoch hat sich keine generelle Auffälligkeit beim Vergleich der jeweiligen AGO mRNA Expressionen zwischen den Melanozyten, den verschiedenen Tumorzelllinien und den gesunden Geweben gezeigt. Zusammenfassend ist die AGO1 und AGO2 mRNA Expression in allen untersuchten Geweben etwas stärker als die mRNA Expression von AGO3 und AGO4.

2 DIE PROTEINEXPRESSION DER ARGONAUT PROTEINE IM MELANOM

Im Folgenden wurde die Proteinexpression der Argonaut Proteine analysiert, da die mRNA Expression der Melanomzelllinien im Vergleich zu den Melanozyten keine Auffälligkeiten zeigten.

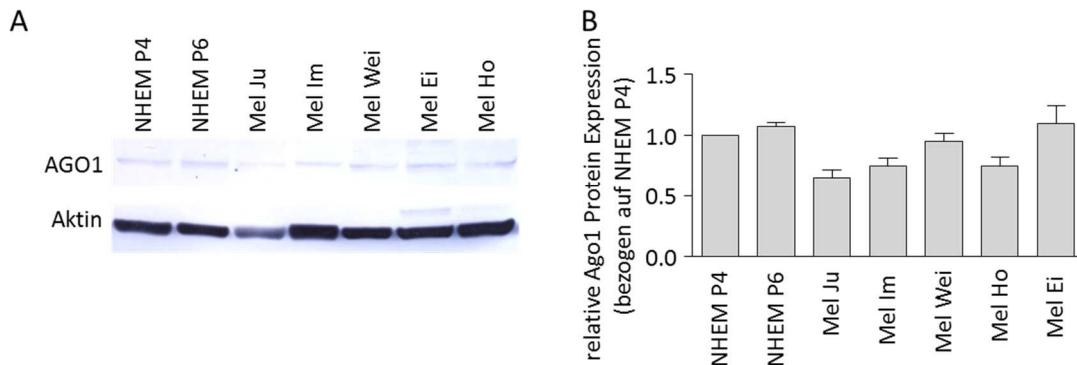


Abbildung III-5: Die Proteinexpression von AGO1 im Melanom. (A) AGO1 Western Blot Analyse mit zugehöriger (B) AGO1 Western Blot Quantifikation zur Bestimmung der AGO1 Proteinexpression in NHEMs aus Passage 4 und 6 und Melanomzelllinien aus Primärtumor (Mel Wei, Mel Ei und Mel Ho) und Metastasen (Mel Ju und Mel Im). Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet.

In den Melanozyten konnte sowohl in Passage 4 (P4) als auch in Passage 6 (P6) eine gleich starke AGO1 Proteinexpression beobachtet werden (siehe Abbildung III-5). Die Melanomzelllinien hingegen lassen eine geringfügige Verringerung der AGO1 Proteinexpression gegenüber den Melanozyten erkennen. Die Metastasenzelllinien Mel Ju und Mel Im weisen eine etwas stärkere AGO1 Reduktion gegenüber den Melanozyten auf als Mel Ho und Mel Wei. Die Melanom Primärtumorzelllinie Mel Ei zeigt eine den NHEMs entsprechende AGO1 Proteinexpression.

Zusammenfassend ergaben sich für AGO1 auf sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen gesunden Melanozyten und Melanomzellen.

Bei der Analyse der AGO2 Proteinexpression konnte, im Gegensatz zur AGO1 Expressionsbestimmung, ein deutlicher Unterschied zwischen den Melanozyten und den Melanomzelllinien nachgewiesen werden. In Abbildung III-6 A und B ist anhand eines AGO2 Western Blot und der AGO2 Western Blot Quantifikation ersichtlich, dass sowohl die Primärtumorzelllinien als auch die Metastasenzelllinien eine signifikant geringere AGO2 Proteinexpression aufweisen als Melanozyten in den Passagen 4 und 6. Dabei ist auch deutlich zu erkennen, dass die Metastasenzelllinien Mel Ju und Mel Im eine stärkere AGO2 Reduktion vorweisen als die Primärtumorzelllinien Mel Ei und Mel Juso.

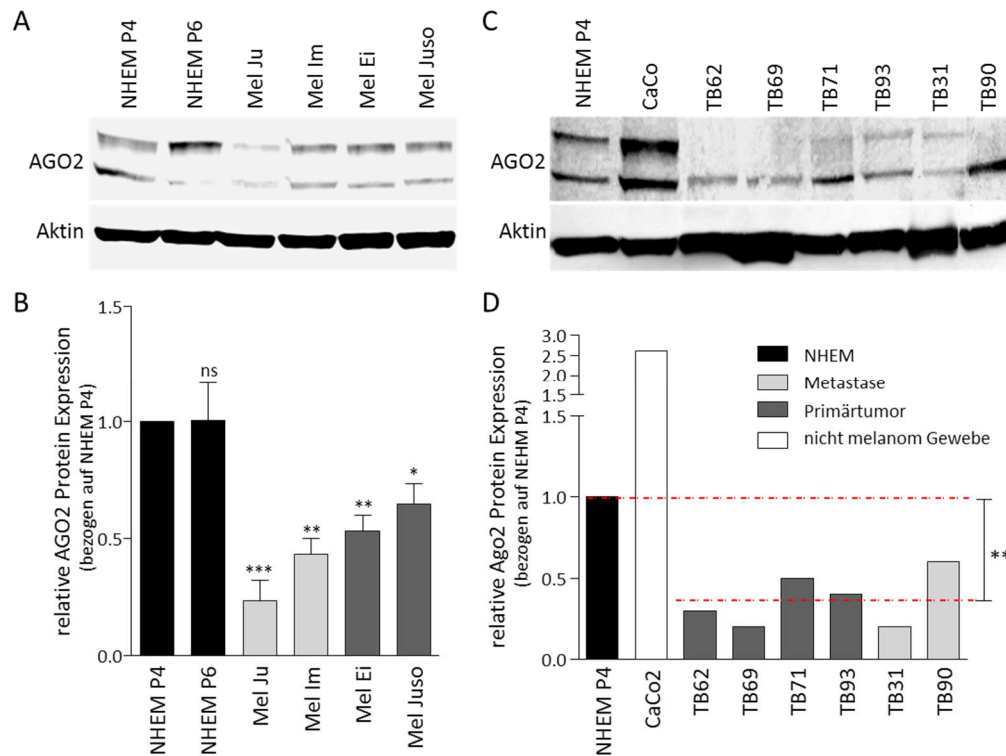


Abbildung III-6: Die AGO2 Proteinexpression im Melanom (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) AGO2 Western Blot Analysen mit zugehöriger (B) AGO2 Western Blot Quantifikation von Melanomzelllinien aus Primärtumor (Mel Ei und Mel Juso) und Metastasen (Mel Ju und Mel Im) im Vergleich zu den Melanozyten aus Passage 4 und 6. (C) AGO2 Western Blot Analysen mit zugehöriger (D) AGO2 Western Blot Quantifikation von Melanomgewebeproben aus Primärtumoren (TB62, TB69, TB71, TB93) und Metastasen (TB31 und TB90) im Vergleich zu Melanozyten der Passage 4 und CaCo2 als „nicht-Melanom“ Tumorzelllinie. Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns=nicht signifikant

Auch die AGO2 Western Blot Analyse (Abbildung III-6 C) und AGO2 Western Blot Quantifikation (siehe Abbildung III-6 D) der Gewebeproben von Melanom Primärtumoren und Metastasen zeigen eine starke AGO2 Reduktion im Vergleich zu Melanozyten der Passage 4 und der exemplarisch verwendeten „nicht-Melanom“ Tumorzelllinie CaCo2. Jedoch zeigen die Gewebeproben aus Metastasengewebe keine stärkere AGO2 Reduktion als die Primärtumorgewebe, wie dies bei den Melanomzelllinien der Fall ist. In der AGO2 Western Blot Quantifikation wurden jeweils die beiden ersichtlichen Banden quantifiziert und zu einem Wert zusammengefasst. Für eine genaue Charakterisierung des AGO2 Bandenmusters siehe Kapitel 4.

Zur Verifikation der durch Western Blot Analysen detektierten AGO2 Reduktion im Melanom wurde eine quantitative AGO2 Immunfluoreszenz Analyse durchgeführt.

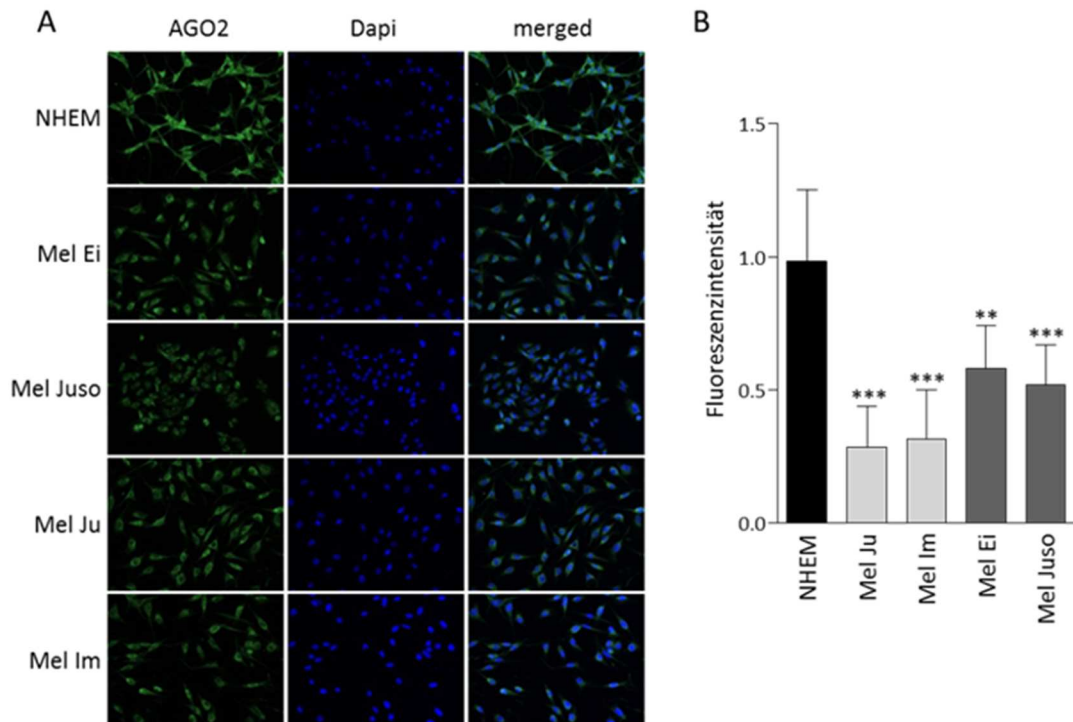


Abbildung III-7: AGO2 Immunfluoreszenz Analysen von Melanozyten und Melanomzelllinien (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) Die AGO2 Immunfluoreszenz Färbungen zeigen eine starke AGO2 Expression in NHEMs. Die Melanom Primärtumorzelllinien Mel Ei und Mel Juso zeigen eine deutlich reduzierte Färbung ebenso wie die Melanom Metastasenzelllinien Mel Ju und Mel Im. (B) Die Immunfluoreszenz Quantifizierung zeigt, dass alle AGO2 Reduktionen im Melanom signifikant sind. Zudem ist erkennbar, dass die Metastasenzelllinien eine stärkere Reduktion des AGO2 Niveaus gegenüber den Melanozyten aufweisen als die Primärtumorzelllinien. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

Die mit dieser Analyse erhaltenen Ergebnisse bestätigen die starke AGO2 Reduktion in Melanomzellen im Vergleich zu den Melanozyten (siehe Abbildung III-7 A). Die Melanozyten zeigen eine starke AGO2 Färbung. Im Vergleich dazu ist die AGO2 Färbung in den Melanomzelllinien erheblich schwächer. Dieses Ergebnis gibt auch die Quantifizierung der AGO2 Immunfluoreszenz in Abbildung III-7 B wieder. Im Vergleich zu den Melanozyten weisen alle Melanomzelllinien eine signifikante Reduktion der AGO2 Proteinexpression auf. In den Metastasenzelllinien Mel Ju und Mel Im ist die AGO2 Reduktion stärker als in den Primärtumorzelllinien.

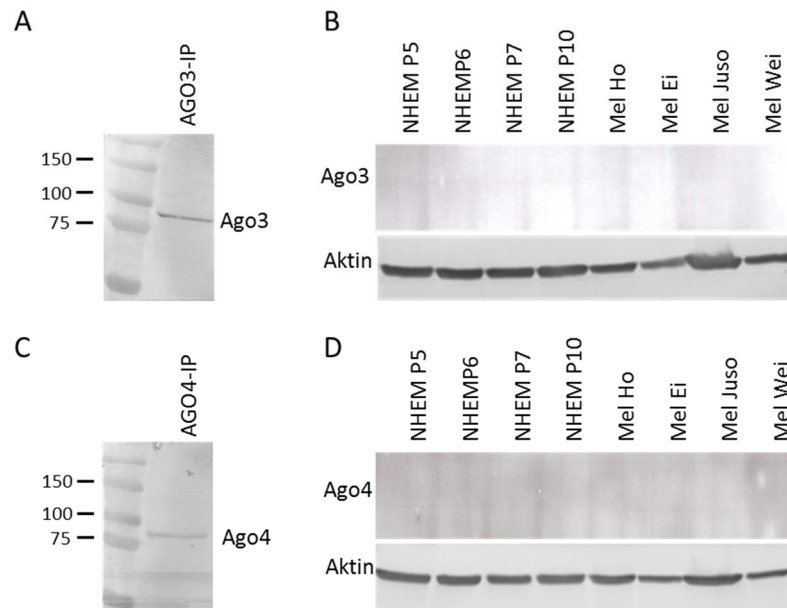


Abbildung III-8: Proteinexpression von AGO3 und AGO4 im Melanom. (A) AGO3 und (C) AGO4 Western Blot Analysen von AGO3 bzw. AGO4 Co-Immunoprecipitationen aus Mel Ju Zellen zum Test des jeweiligen Antikörpers. (B) AGO3 und (D) AGO4 Western Blot Analysen von Melanozyten in verschiedenen Passagen und Melanomzelllinien aus Primärtumor und Metastasen. Es ist keine AGO3 bzw. AGO4 Expression erkennbar. Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet.

Die AGO3 und AGO4 Western Blot Analyse ist für die Bestimmung der AGO3 und AGO4 Proteinexpression nicht ausreichend sensitiv genug. Sowohl in Melanozyten als auch in Melanomzellen zeigten die AGO3 und AGO4 Western Blot Analysen keine spezifische Proteinbande (siehe Abbildung III-8 B und D). Die verwendeten Antikörper sind jedoch prinzipiell für eine Western Blot Analyse verwendbar. Dies wurde durch eine AGO3 und AGO4 Western Blot Analyse einer Positivkontrolle sichergestellt (vgl. Abbildung III-8 A und C). Als Positivkontrolle wurden AGO3 bzw. AGO4 Co-Immunopräzipitationen aus Mel Ju Zellen verwendet. Eine geringere Proteinexpression von AGO3 und AGO4 gegenüber AGO1 und AGO2 war aufgrund der geringeren mRNA Expressionen von AGO3 und AGO4 im Vergleich zu AGO1 und AGO2 zu erwarten, auch wenn ein direkter Vergleich aufgrund unterschiedlicher Antikörper Affinitäten nicht zulässig ist.

3 DIE FEHLREGULIERTE AGO2 EXPRESSION IST SPEZIFISCH FÜR DAS MELANOM

Die Feststellung, dass die AGO2 Proteinexpression in Melanomzellen reprimiert ist, führt zu der Fragestellung, ob die AGO2 Reduktion auch auf andere „nicht-Melanom“ Tumore zutreffend ist, oder ob es sich dabei um ein melanomspezifisches Phänomen handelt. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden durch Western Blot Analysen die Proteinexpressionen von AGO1 und AGO2 in Melanomzellen und in „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien bestimmt.

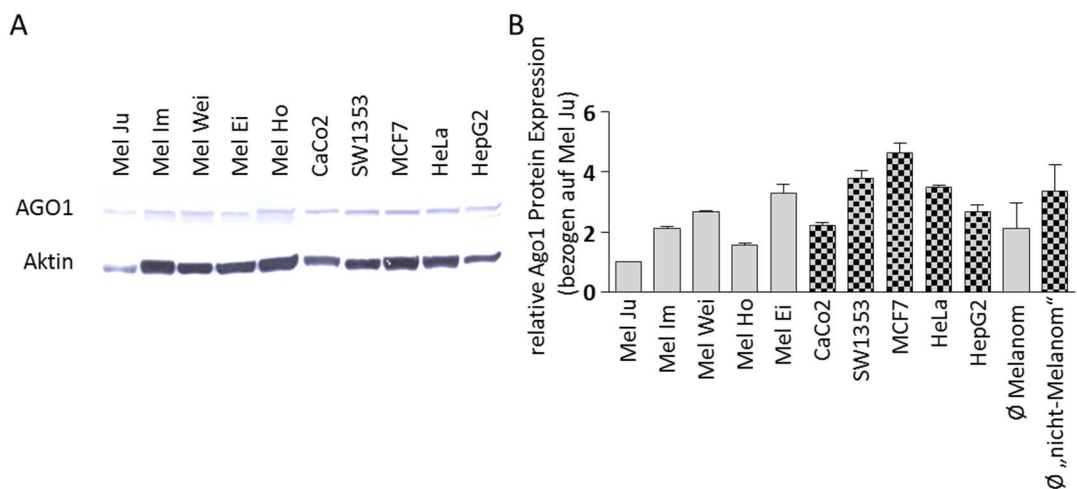


Abbildung III-9: AGO1 Proteinexpression in Melanomzelllinien und in verschiedenen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien. (A) Die AGO1 Western Blot Analyse mit zugehöriger (B) AGO1 Western Blot Quantifikation zeigt, dass die durchschnittliche AGO1 Expression in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien CaCo2, SW1353, MCF7, HeLa, und HepG2 etwas stärker ist als die durchschnittliche AGO1 Expression in den Melanomzelllinien aus Primärtumor (Mel Wei, Mel Ho und Mel Ei) und Metastasen (Mel Ju und Mel Im). Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet.

Die „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien CaCo2, SW1353, MCF7, HeLa und HepG2 zeigen eine einheitliche AGO1 Proteinexpression (siehe Abbildung III-9). Die Zelllinie MCF7 (4,6 fach bezogen auf Mel Ju) und SW1353 (3,7 fach bezogen auf Mel Ju) haben eine geringfügig stärkere AGO1 Proteinexpression als die Zelllinien HeLa (3,5 fach bezogen auf Mel Ju) und HepG2 (2,7 fach bezogen auf Mel Ju). Die Zelllinie CaCo2 hat die schwächste AGO1 Proteinexpression aller analysierter „nicht-Melanom“ Zelllinien (2,2 fach bezogen auf Mel Ju). Bei einem Vergleich der durchschnittlichen AGO1 Proteinexpression der „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien mit den durchschnittlichen Proteinexpressionen der Melanomzelllinien ist erkennbar, dass die Proteinexpression der „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien etwas stärker ist (1,6 fache AGO1 Proteinexpression) als in den Melanomzelllinien. Diese schwache Reduktion der AGO1 Proteinexpression in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien ist jedoch nicht signifikant.

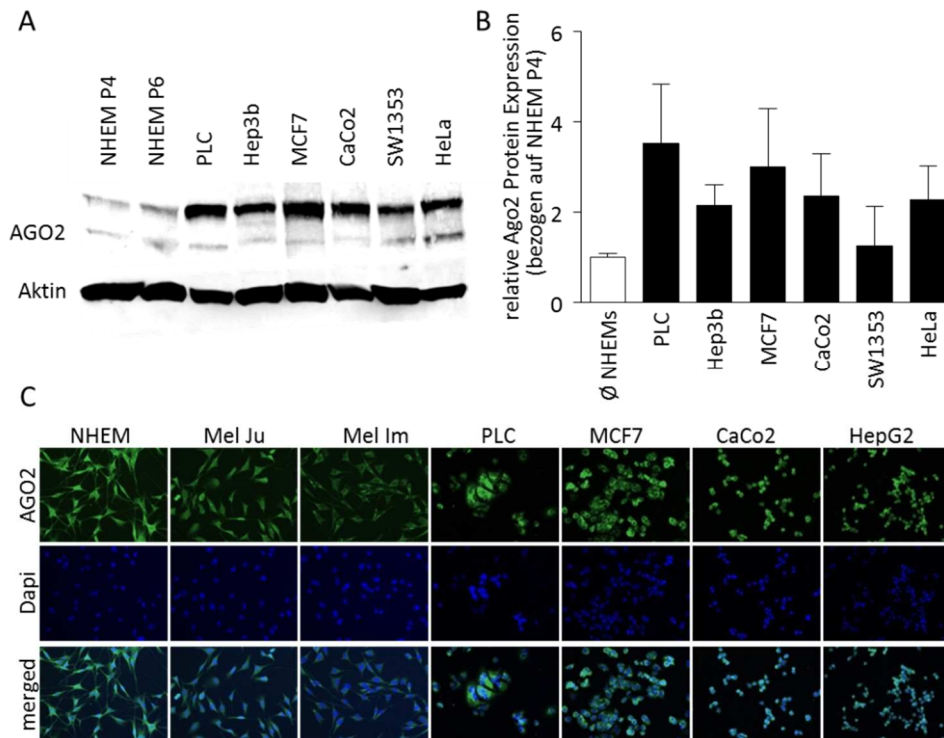


Abbildung III-10: Vergleich der AGO2 Proteinexpression in Melanomzellen mit der in „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien (verändert nach Völler *et al.* (2013)). Die (A) AGO2 Western Blot Analyse mit zugehöriger (B) AGO2 Western Blot Quantifikation zeigt, dass die AGO2 Proteinexpression in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien PLC, Hep3b, MCF7, CaCo2, SW1353 und HeLa deutlich stärker ist als in den Melanozyten der Passage 4 und 6. Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet. (C) Die AGO2 Immunfluoreszenz Analyse zeigt, dass die AGO2 Proteinexpression in Melanozyten der von den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien PLC, MCF7, CaCo2 und HepG2 gleicht, jedoch deutlich stärker ist als in den Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im.

Der Vergleich der AGO2 Proteinexpression in Melanozyten, Melanomzelllinien und anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien ist in Abbildung III-10 dargestellt. Die AGO2 Western Blot Analyse mit der zugehörigen AGO2 Western Blot Quantifikation liefert das Ergebnis, dass die AGO2 Expression in den sechs „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien PLC (3,5 fach bezogen auf NHEM), Hep3b (2,1 fach bezogen auf NHEM), MCF7 (2,9 fach bezogen auf NHEM), CaCo2 (2,3 fach bezogen auf NHEM), SW1353 (1,3 fach bezogen auf NHEM) und HeLa (2,2 fach bezogen auf NHEM) jeweils deutlich stärker ist als in NHEMs. Zur Verifikation der AGO2 Western Blot Analyse wurde eine AGO2 Immunfluoreszenz Analyse durchgeführt. In dieser wurde zusätzlich zu den Melanozyten und den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien noch die Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im verwendet. Die AGO2 Immunfluoreszenz Analyse zeigt eine starke und einheitliche AGO2 Proteinexpression in den Melanozyten und in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien PLC, MCF7, CaCo2 und HepG2. Im Gegensatz zu der AGO2 Western Blot Analyse wurde kein Unterschied in der AGO2 Proteinexpressionsstärke zwischen den NHEMs und den „nicht-Melanom“

Tumorzelllinien festgestellt. Jedoch ist eine starke Reduktion der AGO2 Proteinexpression in den Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im im Vergleich zu NHEMs und den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien erkennbar.

Durch die Methodik der *AGO-affinity purification by peptide* (AGO-APP) kann neben der absoluten Argonaut Proteinkonzentration einer Zelllinie auch der prozentuale Anteil der einzelnen AGO Proteine bestimmt werden. In Abbildung III-11 A ist die prozentuale AGO Proteinverteilung in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien CaCo2, HepG2, SW1353, MCF7 und HeLa, sowie in den Melanomzelllinien Mel Ju, Mel Im, Mel Wei, Mel Ei und Mel Ho dargestellt.

Die Verteilung der Proteinexpression von AGO2 und AGO4 ist in den Melanomzelllinien sehr einheitlich, dabei entfallen zwischen 47 % bis 55 % auf AGO2 und zwischen 7 % und 10 % auf AGO4. Die Verteilung der Proteinexpression von AGO1 und AGO3 zeigt hingegen eine leichte Variation, die für AGO1 26 % bis 40 % und für AGO3 15 % bis 25 % beträgt. Interessanterweise ist die AGO Verteilung der beiden Metastasenzelllinien Mel Im und Mel Ju für alle vier jeweiligen AGO Proteine sehr einheitlich.

Im Vergleich zu den Melanomzelllinien weist die Verteilung der AGO Proteinexpression in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien größere Variationen auf. Beispielsweise zeigt die AGO Expressionsverteilung in HepG2 und CaCo2 sehr starke Expressionswerte für das AGO2 von 82 % bzw. 85 % AGO2 Anteil. Der AGO2 Anteil von SW1353 (39 %), MCF7 (38 %) und HeLa (49 %) ist deutlich geringer als von HepG2 und CaCo2 und entspricht eher dem AGO2 Anteil der Melanomzelllinien. Auch die Verteilung von AGO1 und AGO3 zeigt erhebliche Unterschiede zwischen HepG2 und CaCo2 (9 % bis 16 % AGO1 Anteil; 1 % bis 6 % AGO3 Anteil) im Vergleich zu SW1353, MCF7 und HeLa (16 % bis 28 % AGO1 Anteil; 30 % bis 44 % AGO3 Anteil). Der Proteinexpressionsanteil von AGO4 ist der geringste innerhalb aller „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien und liegt zwischen 0,3 % bis 4 % AGO4 Anteil.

Ein Vergleich der prozentualen AGO mRNA Expressionsverteilung (siehe Abbildung III-1) mit der prozentualen AGO Proteinexpressionsverteilung (vgl. Abbildung III-11) verdeutlicht, dass die AGO Proteine einer post-transkriptionalen Regulation unterliegen. Beispielsweise zeigt AGO4 eine sehr starke Diskrepanz zwischen der mRNA Expression und der Proteinexpression in den Melanomzelllinien Mel Ei (20 % Gen- und 2,9 % Proteinexpression \approx -85 %), Mel Wei (24 % Gen- und 3 % Proteinexpression \approx -88 %) und Mel Im (22 % Gen- und 3 % Proteinexpression \approx -86 %) und in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien HepG2 (24 % Gen- und 1,5 % Proteinexpression \approx -94 %) und SW1353 (18 % Gen- und 3,9 % Proteinexpression \approx -78 %).

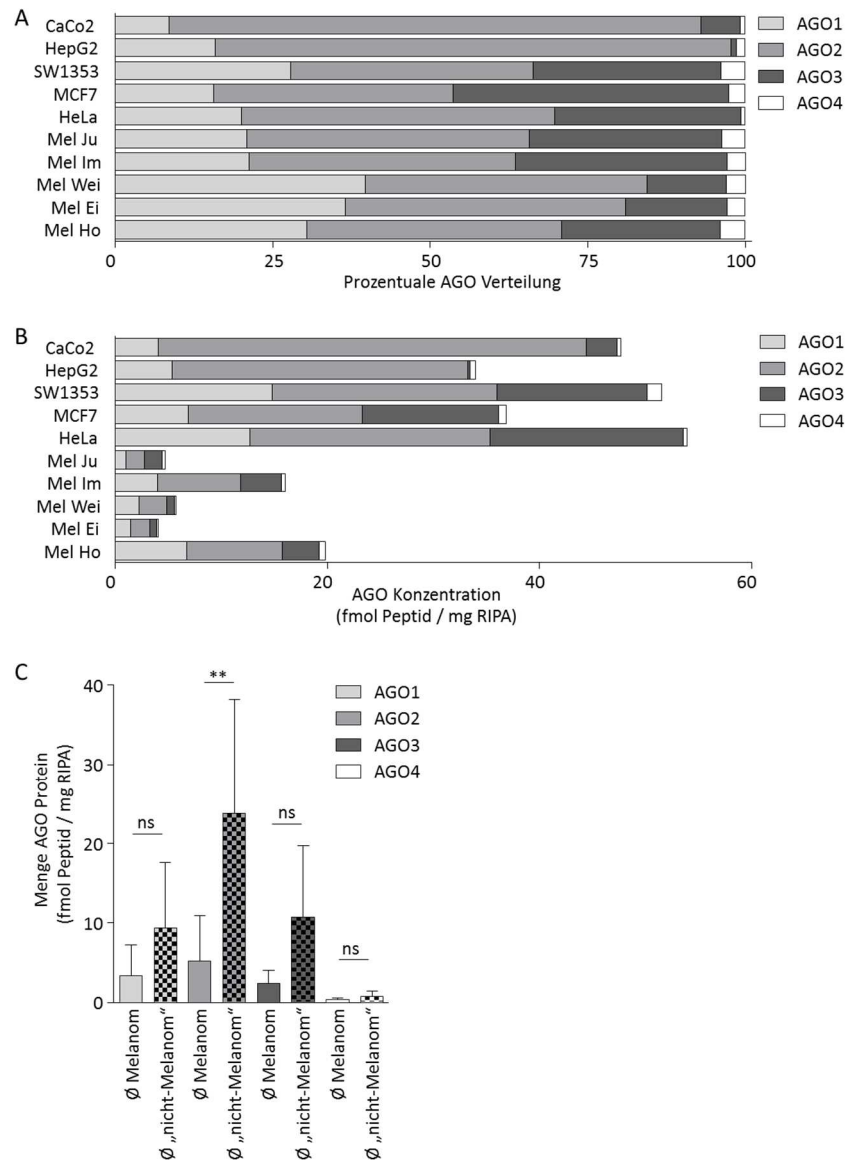


Abbildung III-11: AGO-affinity purification by peptide (AGO-APP) zur Bestimmung der Verteilung und Konzentration der vier AGO Proteine in Melanozyten und anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien. (A) Prozentuale Verteilung und (B) absolute Konzentration der vier AGO Proteine in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien CaCo2, HepG2, SW1353, und HeLa im Vergleich zu den Melanomzelllinien Mel Ju, Mel Im, Mel Wei, Mel Ei und Mel Ho. (C) Vergleich der durchschnittlichen AGO Expression der analysierten Melanomzelllinien mit den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien.

In Abbildung III-11 B ist die Gesamtmenge der AGO Proteinexpression einer Zelllinie in fmol AGO Peptid pro mg Zelllysate (RIPA) dargestellt. Es ist auffällig, dass die Melanomzelllinien sehr geringe AGO Konzentrationen im Vergleich zu den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien aufweisen. Die Gesamtmenge an AGO Protein liegt für die Melanomzelllinien zwischen 5 und 20 fmol AGO Peptid pro mg RIPA. Bei den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien weist die Zelllinie HepG2 die geringste AGO Gesamtproteinkonzentration auf, mit einer Konzentration von 34 fmol AGO Peptid pro mg

RIPA. Die HeLa Zellen hingegen haben die höchste AGO Gesamtkonzentration von über 50 fmol AGO Peptid pro mg RIPA.

Generell ist keine Korrelation zwischen der AGO Gesamtkonzentration und dem Ursprung der Zellen erkennbar, d.h. es gibt keinen Unterschied zwischen den Primärtumorzelllinien (Mel Ho, Mel Wei und Mel Ei) und den Metastasenzelllinien (Mel Im und Mel Ju).

In Abbildung III-11 C ist der Vergleich der durchschnittlichen AGO Gesamtproteinmengen der Melanomzelllinien mit den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien dargestellt. Dabei ist erkennbar, dass die durchschnittlichen Konzentration jedes der vier AGO Proteine im Melanom geringer ist als die jeweilige durchschnittlichen AGO Konzentration in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien. Jedoch ist nur die Reduktion von AGO2 in den Melanomzelllinien gegenüber den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien signifikant.

4 ANALYSE DER AGO2 WESTERN BLOT BANDEN

In allen Quantifikationen der AGO2 Western Blot Analysen wurde jeweils die Menge an Gesamtprotein bestimmt. Hierfür wurde die Signalstärke der im AGO2 Western Blot auftretenden charakteristischen Doppelbande (Abbildung III-12 A), bestehend aus einer kleineren Bande bei ca. 100 kDa und einer größeren Bande bei ca. 120 kDa, mit dem Programm Image J vermessen und zu einem AGO2 Expressionswert addiert.

Um sicher zu stellen, dass es sich bei beiden Banden jeweils um ein spezifisches Antikörpersignal für AGO2 handelt und nicht um ein anderes Argonaut (AGO1, AGO3 oder AGO4) oder gänzlich anderes Protein, wurde eine massenspektrometrische Untersuchung durchgeführt.

Die theoretisch berechnete Proteingröße von AGO2 wurde mit dem online Programm Protparam (<http://web.expasy.org/protparam>) durchgeführt und ergab eine Größe von 97,2 kDa, welches der kleineren AGO2 Bande entsprechen würde.

Für die massenspektrometrischen Analysen wurde eine Silberfärbung eines SDS-Gels mit einer anti-AGO2 Co-IP aus der Melanomzelllinie Mel Ju angefertigt. Die beiden zur Untersuchung verwendeten Banden sind in Abbildung III-12 B durch einen Pfeil (blauer Pfeil = größere Bande; roter Pfeil = kleinere Bande) markiert.

Die durch die massenspektrometrischen Analysen gewonnen Ergebnisse sind in Abbildung III-12 C aufgeführt. Die 8 bzw. 5 identifizierten Peptide der größeren bzw. kleineren Bande haben eine ausreichend große Sequenzabdeckung (9 % Sequenzabdeckung größere Bande bzw. 4 % Sequenzabdeckung kleinere Bande) für die sichere Feststellung, dass in beiden Banden AGO2 enthalten ist. Die AGO2 Aminosäuresequenz mit den identifizierten Peptidsequenzen aus der massenspektrometrischen Untersuchung ist in Abbildung III-12 D dargestellt. Die

Sequenzabdeckung stellt zudem sicher, dass es sich bei der kleineren AGO2 Bande nicht um die um ein Exon verkürzte AGO2 Isoform 2 handeln kann, da ein identifiziertes Peptid aus der kleineren Bande den Sequenzbereich des fehlenden Exons am C-Terminus der AGO2 Transkriptvariante 2 abdeckt.

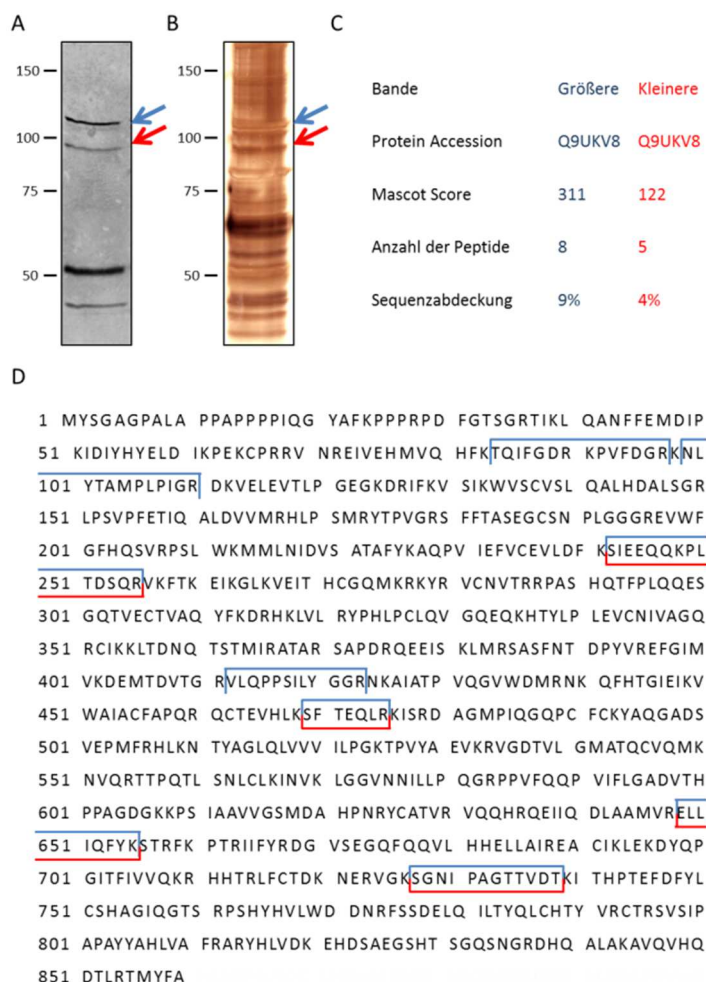


Abbildung III-12: Analyse des AGO2 Western Blot Bandenmusters (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) AGO2 Western Blot und (B) SDS-Page Silberfärbung nach einer AGO2 Co-Immunopräzipitation aus Mel Ju Zellen. Die beiden Banden die zur massenspektrometrischen Untersuchung ausgewählt wurden sind durch einen Pfeil markiert. (C) Die massenspektrometrische Analyse identifizierte 8 bzw. 5 Peptidsequenzen aus AGO2 und erreichte dabei eine 9 bzw. 4 prozentige Sequenzabdeckung für die größere bzw. kleinere AGO2 Bande. (D) Aminosäuresequenz von AGO2 mit den markierten AGO2 Peptidsequenzen die durch die massenspektrometrischen Analysen identifiziert wurden. Die Peptide aus der massenspektrometrischen Analyse der größeren AGO2 Bande sind blau markiert, die der kleineren AGO2 Bande rot.

5 DIE siRNA EFFEKTIVITÄT IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN

Der Einfluss von regulatorischen RNAs auf die Entstehung und Progression von Tumoren ist in vielen Studien belegt worden (Serpico *et al.* 2013; Marin *et al.* 2014; Zagryazhskaya und Zhivotovsky 2014). Dies gilt auch für das maligne Melanom (Kunz 2013; Völler *et al.* 2013). Bei Auswertungen von miRNA Expressionsprofil Analysen ist auffällig, dass in „nicht-Melanom“ Tumoren die miRNA-Expressionsspiegel im Vergleich zu den Spiegeln von gesunden Geweben erniedrigt sind (Wang *et al.* 2012; Zhao *et al.* 2012). Beim malignen Melanom ist jedoch ein gegenteiliger Effekt erkennbar, da die deutliche Mehrheit der miRNAs ist beim Abgleich mit Melanozyten stärker exprimiert ist (Mueller *et al.* 2009). Diese Erkenntnis führte zu der Überlegung, ob die Hemmung der Translation durch eine regulatorische RNA z.B. einer siRNA in unterschiedlichen Geweben verschieden stark ausgeprägt ist. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden zwei verschiedene siRNAs, eine inhibierend für den Transkriptionsfaktor cJun (siehe Abbildung III-13 A) und eine inhibierend für NRAS (Abbildung III-13 B), auf ihre Auswirkung in den „nicht-Melanom“ Zelllinien HEK und HeLa im Vergleich zu den Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im analysiert.

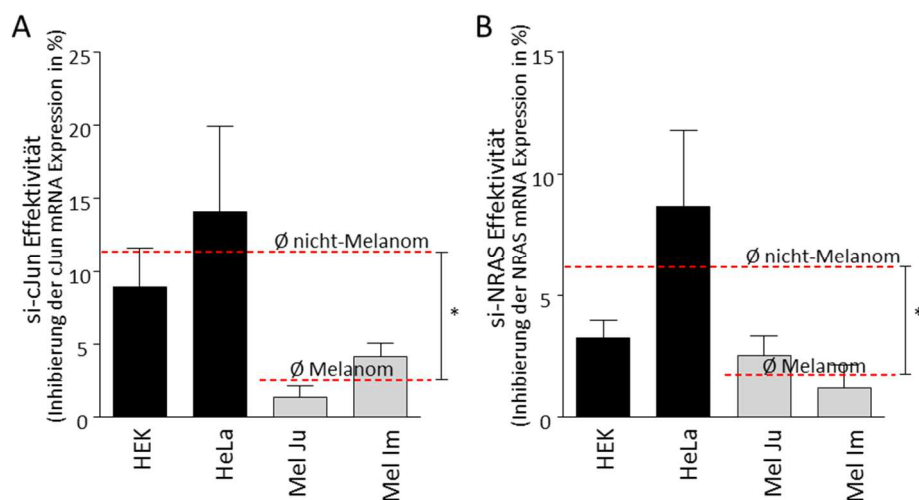


Abbildung III-13: Erhöhte siRNA Effektivität in „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien im Vergleich zu Melanomzelllinien (verändert nach Völler *et al.* (2013)). Inhibition von (A) cJun oder (B) NRAS, 24 Stunden nach Transfektion von si-cJun oder si-NRAS in die „nicht-Melanom“ Zelllinien HEK und HeLa oder in die Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im. Statistisch wurde der Durchschnitt der „nicht-Melanom“ Zelllinien und der Melanomzelllinien durch einen t-Test ausgewertet. * $P < 0,05$

Für beide Modellproteine ist in Abbildung III-13 erkennbar, dass die Hemmung der Genexpression durch die siRNAs in den „nicht-Melanom“ Zelllinien signifikant stärker ausfällt als in den

Melanomzelllinien. Das bedeutet, dass die Effektivität der siRNAs in den analysierten Zelllinien nicht gleich groß ist. Daraus ergibt sich die Fragestellung, wodurch die unterschiedliche siRNA Effektivität hervorgerufen wird. Eine Erklärung könnte in einer zellspezifischen Veränderung von Proteinen liegen, die essentiell für die generelle Funktionalität von siRNAs sind. Somit könnte auch die bereits in dieser Arbeit festgestellte Reduktion der AGO2 Konzentration in Melanomzellen Ursache der geringeren Effektivität von regulatorischen RNAs sein.

6 EINFLUSS VON AGO2 AUF DIE EFFEKTIVITÄT VON REGULATORISCHEN RNAs

6.1 REEXPRESSION VON AGO2 IN MELANOMZELLEN

Obwohl festgestellt werden konnte, dass AGO2 im Melanom stark reduziert vorliegt, gibt es keinen Beweis, dass AGO2 auch ursächlich für die geringere siRNA Effektivität verantwortlich ist. In dem folgenden Versuchsabschnitt wird daher versucht die Frage zu beantworten, ob und gegebenenfalls welchen Einfluss die Menge an verfügbarem AGO2 auf die Funktionalität von regulatorischen RNAs hat.

Die Fehlregulation von AGO2 in Melanomzellen ist ein posttranskriptionales Phänomen, d.h. nach einer AGO2 mRNA Expression auf gleichem Niveau wie in NHEMs erfolgt eine gehemmte AGO2 Translation. Daher muss zunächst überprüft werden, ob sich die AGO2 Konzentration durch eine plasmidbasierte AGO2 Proteinexpression generell erhöhen lässt. Hierzu wurden steigende Plasmidkonzentrationen des AGO2 Expressionsplasmids pAGO2 in Mel Ju Zellen transfiziert und die Proteinexpression in Western Blot Analysen im Vergleich zu den mit pIRES kontrollbehandelten Mel Ju Zellen untersucht (Abbildung III-14).

Die Versuchsergebnisse belegen, dass eine Reexpression von AGO2 durch eine transiente Transfektion von pAGO2 in Melanomzellen möglich ist. Dabei erreichen die Mel Ju Zellen eine ca. 3,5 fache Erhöhung der AGO2 Proteinexpression durch die Transfektion von 2 µg pAGO2. Dies ist ausreichend um die festgestellte AGO2 Reduktion der Mel Ju Zellen gegenüber den NHEMs auszugleichen (Abbildung III-6). Die Zunahme des Plasmid-basierten AGO2 ist in der AGO2 Western Blot Analyse deutlich vom endogenen AGO2 zu unterscheiden. Die Unterscheidung ist möglich, da eine Modifikation in Form eines N-terminalen HA- und Flag-Tags an das rekombinante AGO2 erfolgt. Der errechnete Größenunterschied zwischen dem endogenen und exogenen AGO2 beträgt, bedingt durch die Protein-Affinität-Tags, ca. 5,1 kDa.

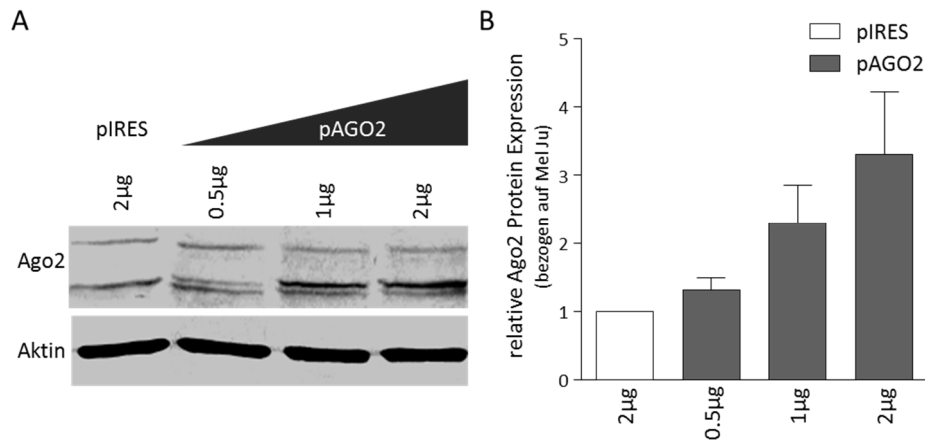


Abbildung III-14: Reexpression von AGO2 in die Melanomzelllinie Mel Ju (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) Western Blot Analyse zur Bestätigung der AGO2 Reexpression bei steigenden pAGO2 Plasmidkonzentrationen von 0,5 µg, 1 µg und 2 µg im Vergleich zu den mit 2 µg pIRES kontrollbehandelten Mel Ju Zellen. Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet. (B) AGO2 Western Blot Quantifikation zur Bestimmung des Expressionsniveaus nach Reexpression von Mel Ju Zellen wie in (A) beschrieben. Bei einer Transfektion von 2 µg pAGO2 in Mel Ju Zellen wird das Expressionsniveau von NHEM Zellen erreicht, was einer Expressionssteigerung um das 3,5 fache entspricht.

Ein Vergleich der Exprimierbarkeit von AGO1 und AGO2 zeigt jedoch sehr deutlich (Abbildung III-15), dass die Expression von AGO1 bei gleicher Plasmidkonzentration in Melanomzellen ein höheres Expressionsniveau erreicht als dies bei AGO2 der Fall ist. Dies könnte ein Hinweis sein, dass die Expression von AGO2 einer posttranskriptionalen Regulation unterliegt, die die Expression von AGO1 nicht beeinflusst.

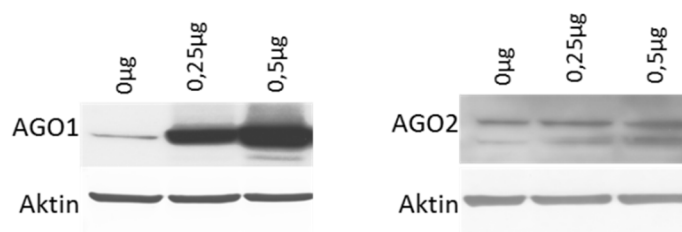


Abbildung III-15: Vergleich der Exprimierbarkeit von AGO1 und AGO2 in Melanomzellen. (A) AGO1 und (B) AGO2 Western Blot Analyse zum Vergleich der Exprimierbarkeit der beiden AGO Proteine. Dabei wurde AGO1 bzw. AGO2 mit steigenden Plasmidkonzentrationen (0 µg, 0,25µg 0,5 µg) von pAGO1 bzw. pAGO2 in die Melanomzelllinie Mel Ju transient transfiziert.

6.2 ANALYSE VON AGO2 AUF DIE TRANSFEKTIONSEFFIZIENZ VON RNAs

Für die Bestimmung des Einflusses von AGO2 auf regulatorische RNAs in Melanomzellen ist es nötig, sowohl AGO2 als auch kleine RNA Moleküle gleichzeitig transient zu transfizieren. Daher ist es wichtig auszuschließen, dass die Reexpression von pAGO2 nicht die prinzipielle Transfizierbarkeit von RNAs beeinflusst. Um diese mögliche Beeinflussung zu analysieren, wurden die Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im jeweils mit 2 µg pIRES oder 2 µg pAGO2 transfiziert und der Transfektionserfolg mittels AGO2 Western Blot überprüft (Abbildung III-16 A). Anschließend wurde ein Oligonukleotid (si-GLO), das an einen Fluoreszenzfarbstoff DY547 (Absorption 557 nm/Emission 570 nm) gekoppelt ist, ebenfalls in die mit pAGO2 und pIRES behandelten Zellen transfiziert.

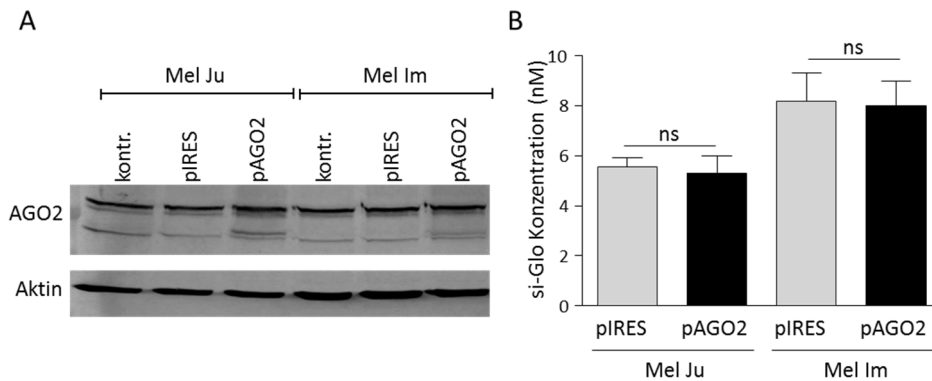


Abbildung III-16: Einfluss der AGO2 Reexpression auf die Transfektionseffizienz von siRNAs (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) AGO2 Western Blot zur Bestätigung der AGO2 Reexpression mit 2 µg pAGO2 im Vergleich zu pIRES kontrollbehandelten Mel Ju und Mel Im Zellen. Aktin wurde als Western Blot Ladekontrolle verwendet. (B) Quantitative Mengenbestimmung der transfizierten si-GLO in Mel Im und Mel Ju Zellen in Abhängigkeit von einer AGO2 Reexpression. Es ist keine Korrelation bezüglich der AGO2 Reexpression und der Aufnahmefähigkeit von Melanomzellen erkennbar. P=ns

Über die gemessene Fluoreszenzintensität der Mel Ju und Mel Im Zellen kann durch einen Abgleich mit einer Standardkurve welche die Fluoreszenz definierter si-GLO Konzentrationen beinhaltet die Konzentration der transfizierten si-GLO quantitativ bestimmt werden. Es zeigt sich, dass die Reexpression von AGO2 in Melanomzellen keinen Einfluss auf die Transfektion von kurzen RNA Molekülen hat (Abbildung III-16 B). Somit ist sichergestellt, dass eine Beeinflussung der Transfektionseffizienz durch eine Modulation des AGO2 Spiegels ausgeschlossen ist.

6.3 AUSWIRKUNG DER AGO2 MODULATION AUF DIE FUNKTION VON siRNAs

Der folgende Versuchsteil soll Aufschluss darüber geben, ob die melanomspezifische Reduktion von AGO2 eine Auswirkung auf die Effektivität von regulatorischen RNAs hat. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde der Transkriptionsfaktor cJun als Modellprotein verwendet, da er im Melanom eine sehr hohe Expressionsrate aufweist. Diese starke cJun Expression ist zurückzuführen auf eine melanomspezifisch schwache miRNA-125b Expression. Die miRNA-125b bindet direkt in der kodierenden Sequenz von cJun und wirkt daher als deren Negativregulator (Kappelmann *et al.* 2013). Die Überexpression von cJun im Melanom und die Regulation durch eine miRNA machen cJun ein ideales Modellprotein zur Beantwortung dieser Fragestellung.

Zunächst wurden Mel Ju Zellen, die eine geringere AGO2 Proteinkonzentration aufweisen als andere Melanomzellen mit 2 µg pAGO2 oder mit 2 µg Kontrollplasmid pIRES transfiziert und 48 Stunden inkubiert, bevor der Reexpressionserfolg durch eine AGO2 Western Blot Analyse überprüft wurde. Anschließend wurden die Zellen zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen (2, 4, 7,5, 15 und 30 pmol) einer cJun regulierender siRNA (si-cJun) oder 15 pmol einer unspezifischen siRNA als Kontrolle, behandelt (Abbildung III-17).

Die signifikante Zunahme der siRNA Effektivität ist in Abbildung III-17 A deutlich daran zu erkennen, dass sich nach der AGO2 Reexpression im Vergleich zu den kontrollbehandelten Mel Ju Zellen die Hemmung von cJun um 70 % pro pmol transfizierter si-cJun ansteigt.

In der Abbildung III-17 B ist die Inhibition von cJun in Mel Ju Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen siRNA Konzentrationen dargestellt. Die Grafik zeigt, dass in AGO2 reexprimierenden Mel Ju Zellen die si-cJun Effektivität im Vergleich zu pIRES kontrollbehandelten Zellen deutlich zunimmt. Dies trifft auf alle getesteten si-cJun Konzentrationen zu. Lediglich bei 4 pmol si-cJun transfizierten Mel Ju Zellen ist der Anstieg der si-cJun Effektivität zwar erkennbar, jedoch nicht signifikant. In den Mel Ju Zellen, die mit einer si-Kontrolle (si-ctrl.) transfiziert wurden ist ebenfalls ein geringer aber signifikanter Anstieg der cJun Inhibition nach der Reexpression von AGO2 im Vergleich zu kontrolbehandelten Zellen erkennbar. Dieses Phänomen ist erklärbar durch eine AGO2 basierte Effektivitätssteigerung von endogenen miRNAs die cJun regulieren, beispielsweise die miRNA-125b.

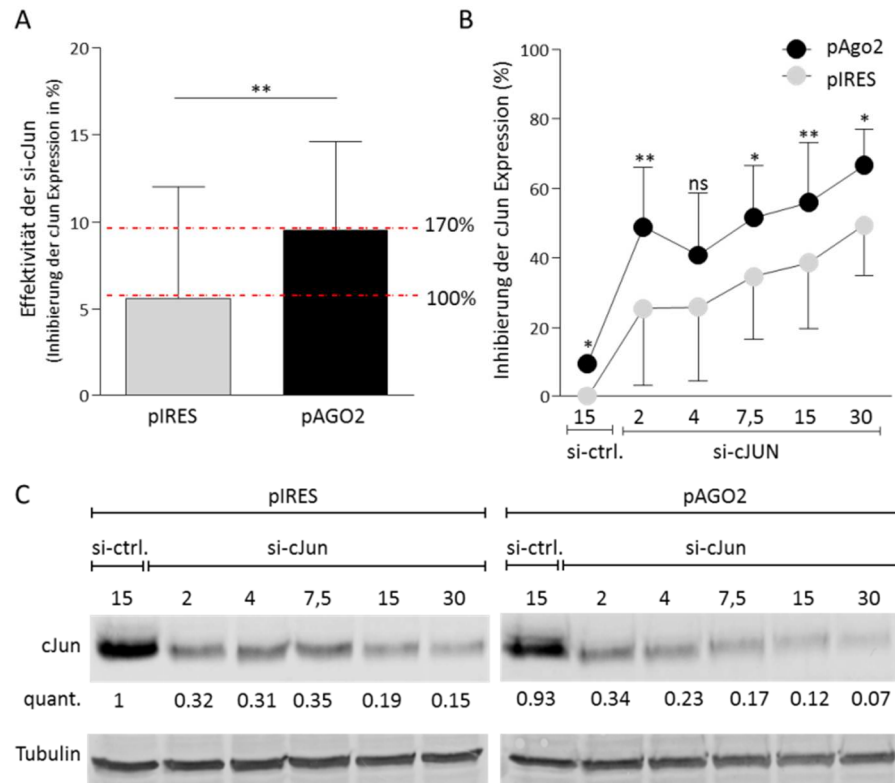


Abbildung III-17: Die Menge an verfügbarem AGO2 ist für die siRNA Effektivität entscheidend (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) cJun qRT-PCR Analyse von Mel Ju Zellen, die mit 2 µg pIRES (Kontrolle) oder 2 µg pAGO2 und jeweils einer si-cJun behandelt wurden. Die Darstellung zeigt die cJun Inhibierung pro pmol transfizierter si-cJun und belegt eine 70 %ige Effektivitätssteigerung der si-cJun nach AGO2 Reexpression. (B) cJun qRT-PCR und (C) cJun Western Blot Analysen zeigen einen signifikanten Anstieg der cJun Inhibition nach Transfektion von 2 µg pAGO2 im Vergleich zu kontrollbehandelten (2 µg pIRES) Mel Ju Zellen bei einer konzentrationsabhängigen si-cJun Behandlung (2, 4, 7,5, 15 und 30 pmol si-cJun und 15 pmol si-ctrl.) Tubulin diente als Western Blot Ladungskontrolle. *P<0,05, **P<0,01, ns=nicht signifikant

Die deutlichen Effekte der gesteigerten si-cJun Effektivität auf die cJun mRNA Expression nach einer AGO2 Reexpression in Melanomzellen wurde durch eine Analyse der cJun Proteinexpression überprüft und bestätigt. Hierfür wurde ein identischer Versuchsaufbau gewählt, bei dem nach einer AGO2 Reexpression im Vergleich zu pIRES kontrollbehandelten Mel Ju Zellen eine Behandlung mit steigenden si-cJun Konzentrationen erfolgte. Zur Detektion der cJun Proteinexpression wurde eine cJun Western Blot Analyse mit anschließender Quantifikation durchgeführt (Abbildung III-17 C). Dabei ist ebenfalls erkennbar, dass die cJun Proteinexpression stärker durch si-cJun inhibiert wird wenn in die Melanomzellen zuvor AGO2 reexprimiert wurde.

6.4 AUSWIRKUNGEN DER AGO2 MODULATION AUF ZU PROZESSIERENDE REGULATORISCHE RNAs

Im vorherigen Versuchsteil (siehe 6.3) dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Reexpression von AGO2 in Melanomzellen zu einer gesteigerten Effektivität von siRNAs führt.

siRNAs unterscheiden sich von miRNAs dadurch, dass sie nicht durch eine Enzymkaskade prozessiert werden müssen. Die Argonaut Proteine werden, genau wie beispielsweise Drosha und DICER, zu den miRNA prozessierenden Proteinen gezählt, da sie die pre-miRNA zu einer AGO2-*cleaved precursor* miRNA (ac-pre-miRNA) prozessiert (Diederichs und Haber 2007). Aufgrund dessen ergibt sich die Fragestellung, ob die siRNA Ergebnisse auf zu prozessierende regulatorische RNAs übertragbar sind.

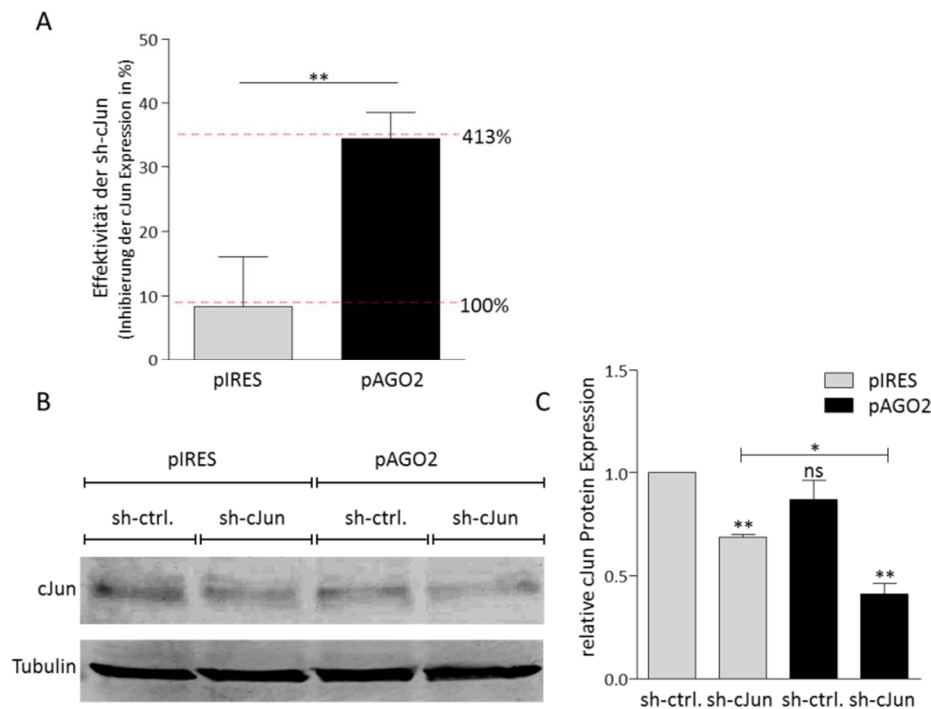


Abbildung III-18: Die AGO2 Expression ist für die shRNA Funktionalität entscheidend (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) qRT-PCR Analyse zur Bestimmung der sh-cJun Effektivität in der Melanomzelllinie Mel Ju die mit 2 µg pIRES (Kontrolle) oder 2 µg pAGO2 transfiziert wurden. Analysiert wurde die Hemmung von cJun pro µg transfizierte sh-cJun. (B) cJun Western Blot und (C) cJun Western Blot Quantifikation von Mel Ju Zellen, die mit 2 µg pIRES oder 2 µg pAGO2 und jeweils entweder mit 2 µg sh-cJun oder 2 µg sh-ctrl. transfiziert wurden. Tubulin diente als Ladungskontrolle. *P<0,05, **P<0,01

Hierzu wurde eine noch zu prozessierende *short hairpin* RNA, die cJun (sh-cJun) reguliert, als Modellsystem verwendet. Es zeigt sich, dass nach einer AGO2 Reexpression die sh-cJun basierte cJun Inhibition im Vergleich zu den mit pIRES kontrollbehandelten Mel Ju Zellen um das vierfache ansteigt (Abbildung III-18 A). Auch in der cJun Western Blot Analyse (Abbildung III-18 B) und der zugehörigen Quantifikation (Abbildung III-18 C) ist deutlich erkennbar, dass die Effektivität der sh-cJun nach der AGO2 Reexpression stark zunimmt. In den pIRES kontrollbehandelten Zellen beträgt die cJun Expressionsreduktion 30 %. Nach der Transfektion von 2 µg pAGO2 steigt die Inhibition

von cJun auf ca. 60 %. Dies entspricht einer Verdopplung der cJun Effektivität nach der Reexpression von AGO2 in die Melanomzelllinie Mel Ju.

7 DER AGO2 INTERAKTIONSPARTNER GW182

Die Erkenntnis, dass sich die Reduktion von AGO2 im Melanom auf die Effektivität von siRNAs und miRNAs auswirkt führt zu der Frage, ob auch AGO2 Interaktionspartner durch die AGO2 Reduktion beeinflusst werden. Die für die Inhibierung der Translation wichtigsten AGO Interaktionspartner sind die Proteine der GW182 Proteinfamilie. Diese sind nach ihrer „Rekrutierung“ durch eines der vier AGO Proteine für alle weiteren Prozesse der Translationshemmung verantwortlich. Im Folgenden wurde die Expression des GW182 Proteins TNRC6A untersucht.

Die Expressionsanalyse in Abbildung III-19 A zeigt, dass die TNRC6A Expression in den Melanozyten mit zunehmender Passage leicht ansteigt. In den Melanomzelllinien weisen lediglich Mel Ei und SkMel28 eine etwas geringere TNRC6A Expression auf, alle anderen getesteten Melanomzelllinien zeigen ein den NHEMs entsprechendes Expressionsniveau. Auch die „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien weisen keine Auffälligkeiten in der Expressionsstärke auf. Eine Ausnahme bildet die Zelllinie Hep3b, die als einzige eine um das 3,5 fach gesteigerte Expression des GW182 Proteins zeigt. Generell ist keine Korrelation zwischen der AGO2 Konzentration einer Zelllinie und ihrer TNRC6A mRNA Expression erkennbar.

Auch eine experimentelle Änderung der AGO Konzentration durch eine AGO2 Reexpression in die Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im hat keinen Einfluss auf die Expression der GW182 Proteinvarianten TNRC6A, TNRC6B und TNRC6C (Abbildung III-19 B-D).

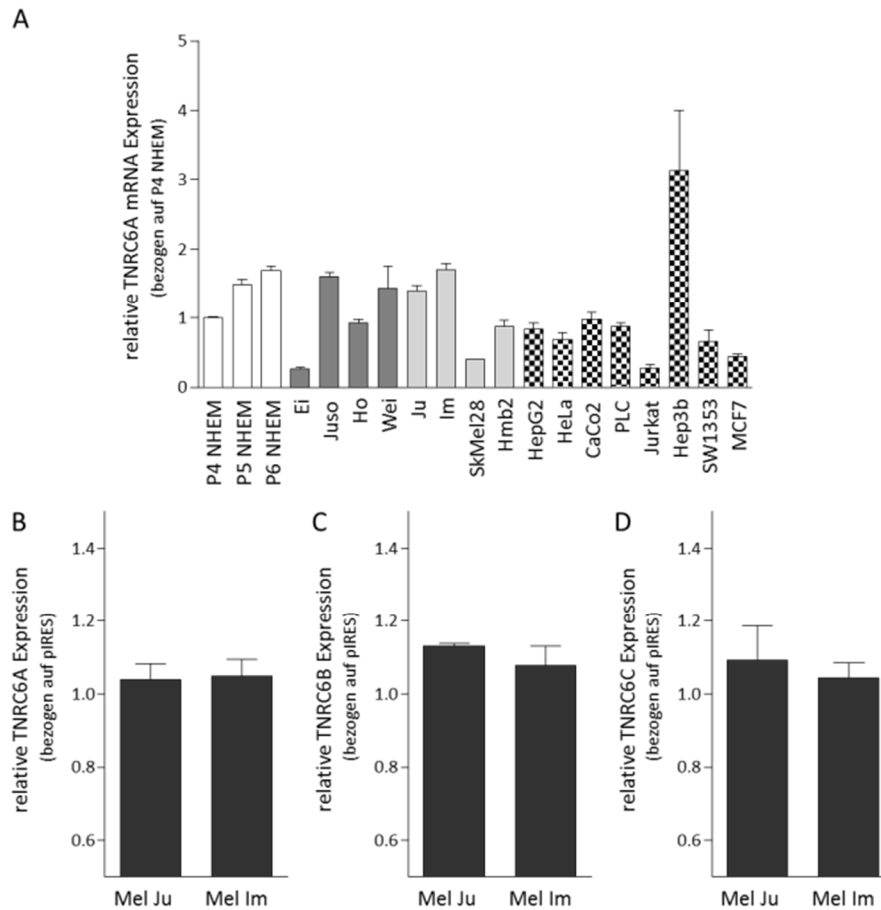


Abbildung III-19: Die Expression des GW182 Proteins TNRC6 in NHEMs, Melanomzelllinien und anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien. A) Expressionsanalyse von TNRC6A in den Melanozyten in den Passagen 4, 5 und 6, in den Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Juso, Mel Ho, Mel Wei, Mel Ju, Mel Im, SKMel28 und Hmb2 sowie in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien HepG2, HeLa, CaCo2, PLC, Jurkat, SW1353 und MCF7. (B-D) cDNA Array zum Expressionsvergleich der drei TNRC6 Varianten (B) TNRC6A, (C) TNRC6B und (D) TNRC6C nach AGO2 Reexpression (2 µg pAGO2) im Vergleich zu kontrollbehandelten (2 µg pIRES) Mel Ju und Mel Im Zellen. Es ist keine signifikante Expressionsänderung der drei TNRC6 Varianten durch eine AGO2 Reexpression erkennbar.

8 AGO2 REDUKTION DURCH PROTEASOMABBAU

Die maligne Transformation von Zellen zu Tumorzellen kann unter anderem durch einen fehlregulierten Proteinabbau verursacht werden. Das Proteasom-System kann durch einen gestörten Proteinabbau von Schlüsselenzymen der Zellorganisation zu einem erheblichen Anteil zu den charakteristischen Tumormerkmalen beitragen. Diese sind beispielsweise für die Proliferation, Differenzierung, Apoptose oder die Zellzyklus-Progression verantwortlich (Johnson 2014). Auch im Melanom werden verschiedene Proteasominhibitoren auf ihren möglichen Therapie-Einsatz getestet (Shahshahan *et al.* 2011). Daher könnte auch die auf Proteinebene

stattfindende AGO2 Reduktion im Melanom durch eine Fehlregulation des Proteasomsystems verursacht werden.

Der Abbau von Proteinen durch das Proteasom erfolgt nicht zufällig, sondern ist ein sehr proteinspezifischer und stark reglementierter Prozess. Dabei wird das Protein, welches durch das Proteasom degradiert werden soll, zum Beispiel durch eine Anlagerung von Ubiquitin-Proteinen für den Abbau markiert. Diese Markierung durch Ubiquitin erfolgt über eine Enzymkaskade (Hanzelmann *et al.* 2012), bei der letztendlich das Ubiquitin über eine zielproteinspezifische Ligase (E3) mit dem zu degradierenden Protein verknüpft wird. Die spezifische E3 Ligase für AGO2 ist *lineage variant 41* (LIN41) oder das orthologe *tripartite motif 71* (TRIM71) (Rybak *et al.* 2009). Eine gesteigerte Expression von TRIM71 im Melanom und damit einhergehend ein gesteigerter AGO2 Abbau könnte eine mögliche Erklärung für die AGO2 Reduktion darstellen.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde die Expression von TRIM71 in Melanozyten der Passage 4, 5 und 6, in verschiedenen Melanomzelllinien aus Primärtumor und Metastasen und in „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien bestimmt.

In Abbildung III-20 A ist die relative TRIM71 Expression bezogen auf NHEMs in Passage 4 dargestellt. Es zeigt sich, dass die TRIM71 mRNA Expression in den Melanozyten mit steigender Passagenzahl zunimmt. Jedoch ist keine Erhöhung der Trim71 mRNA Expression in den Melanomzelllinien im Vergleich zu den Melanozyten erkennbar. Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn ein gesteigerter Proteinabbau basierend auf einer gesteigerten AGO2 Ubiquitinierung für die AGO2 Reduktion in Melanomzellen verantwortlich wäre. Zudem ist kein Unterschied zwischen den Primärtumoren und Metastasen ersichtlich, was eine Begründung für die steigende AGO2 Reduktion in der Tumorgenese hätte darstellen können. Auch in den „nicht-Melanom“ Tumoren ist die TRIM71 Expression stark variierend. Beispielsweise zeigen HeLa, CaCo2, SW1353 und MCF7 eine geringe TRIM71 Expression, wohingegen die Expression in PLC und Jurkat Zelllinien sehr stark gesteigert ist.

Eine weitere Analyse dient dazu den Einfluss des Proteasom-Systems auf AGO2 zu untersuchen. Dabei wurde das Proteasom-System durch den Proteasom-Inhibitor MG132 inhibiert und anschließend die Exprimierbarkeit von AGO2 analysiert. Die AGO2 Western Blot Analyse in Abbildung III-20 B zeigt, dass es in Abwesenheit des Proteasominhibitors zu einem erwarteten Anstieg der AGO2 Expression bei Transfektion steigender pAGO2 Plasmidkonzentrationen in Mel Ju Zellen kommt. Als Versuchskontrolle wurde β -Catenin verwendet, welches an der Signaltransduktion im Wnt-Signalweg beteiligt ist und über das Proteasomsystem reguliert wird (Zhou *et al.* 2008). Die β -Catenin Western Blot Analyse zeigt keinen Expressionsanstieg bei Transfektionen mit steigenden pAGO2 Konzentrationen. Nach Zugabe des MG132 Inhibitors ist in

der AGO2 Western Blot Analyse erkennbar, dass es zu keiner weiteren Steigerung der AGO2 Expression bei gleicher pAGO2 Konzentration im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen kommt. Dass die experimentelle Inhibition des Proteasoms durch den Proteasominhibitor erfolgreich war, ist an der ansteigenden β -Catenin Proteinexpression gut zu erkennen. Somit kann das Proteasom-System als AGO2 regulierende Struktur im Melanom ausgeschlossen werden.

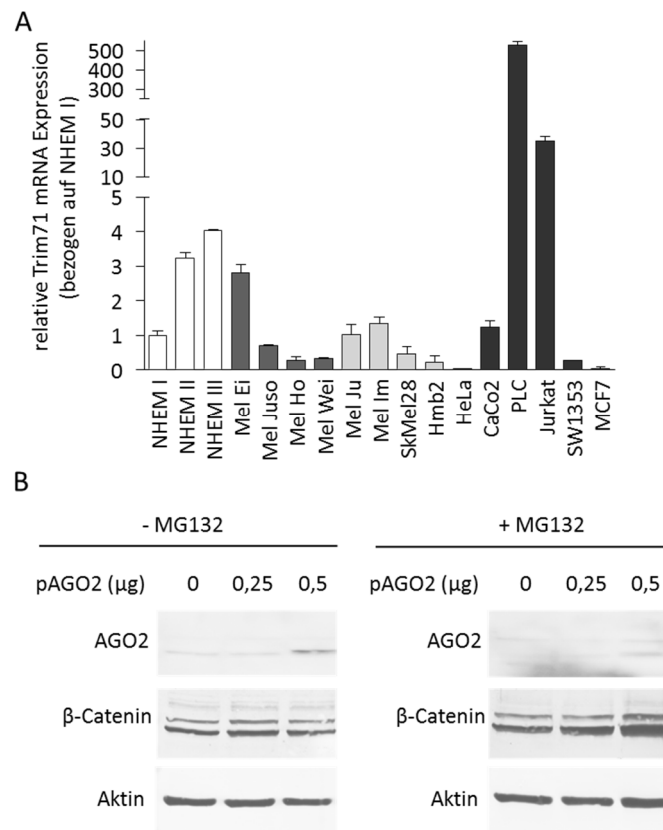


Abbildung III-20: Die AGO2 Reduktion im Melanom erfolgt nicht über das Proteasom-System. (A) Die Expression von TRIM71 wurde in Melanozyten in den Passagen 4, 5 und 6, in den Melanomzelllinien Mel Ei, Mel Juso, Mel Ho, Mel Wei, Mel Ju, Mel Im, SkMel28 und Hmb2 sowie in den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien HeLa, CaCo2, PLC, Jurkat, SW1353 und MCF7 bestimmt. Die TRIM71 Expressionsanalyse ergab, dass keine Zunahme der Trim71 Expression in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten erkennbar ist. Eine stark gesteigerte TRIM71 Expression zeigten die „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien PLC und Jurkat, wohingegen HeLa und MCF7 fast keine TRIM71 Expression aufweisen. (B) Die AGO2 Western Blot Analysen zeigte keine stärkere AGO2 Reexpression bei steigenden pAGO2 Plasmidkonzentrationen in MG132 behandelten Mel Ju Zellen im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen. β -Catenin wurde als Positivkontrolle für die MG132 Behandlung von Melanomzellen verwendet und Aktin diente als Ladungskontrolle.

9 REGULIERUNG VON AGO2 DURCH MIRNAS

9.1 AGO2 UNTERLIEGT EINER REGULATION DURCH MIRNAS

Bei einem Vergleich der plasmidbasierten Expression von AGO1 und AGO2 ist auffällig, dass bei gleichen Plasmidkonzentrationen die Konzentrationserhöhung von AGO1 erheblich stärker ist als von AGO2. Dieses Phänomen ist durch eine posttranskriptionelle Regulation von AGO2 erklärbar, die jedoch nicht AGO1 beeinflusst. Neben dem bereits analysierten fehlregulierten Proteinabbau können prinzipiell eine Vielzahl an Regulationsmechanismen für eine spezifische AGO2 Regulation in Frage kommen.

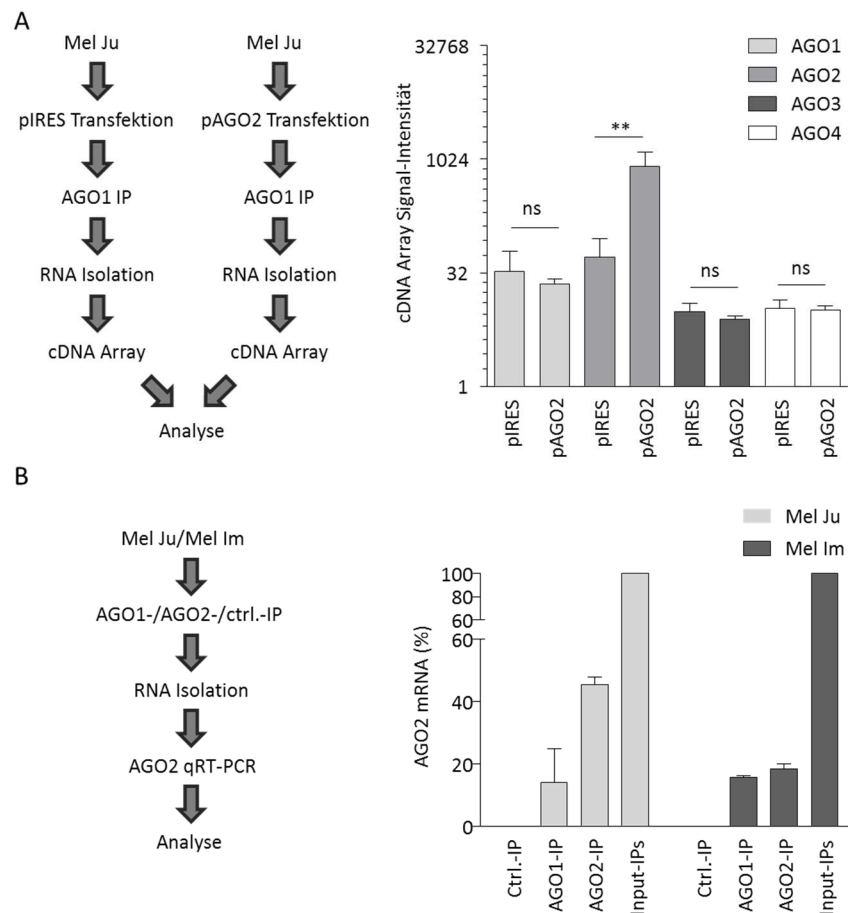


Abbildung III-21: Nachweis der AGO2 Regulation durch miRNAs. (A) Schematische Skizze über die Versuchsdurchführung, bei der eine AGO1 Immunopräzipitation von pIRES oder pAGO2 transfizierten Mel Ju Zellen mit anschließender RNA Isolation durchgeführt wurde. Quantifiziert wurde die RNA durch einen cDNA Array, bei dem die anschließende Datenanalyse zeigte, dass nach der AGO2 Reexpression signifikant mehr AGO2 mRNA an den AGO1 RISC gebunden wurde im Vergleich zur Kontrolle. (B) AGO2 qRT-PCR nach AGO1 und AGO2 Co-Immunopräzipitation im Vergleich zu einer Co-immunopräzipitations-Kontrolle (ctrl.-IP) für einen AGO2 Abbaunachweis durch einen AGO1 oder AGO2 basierten RISC.

Einen möglichen Hinweis auf AGO2 Regulation durch miRNAs zeigte ein Versuch, bei dem AGO2 in der Melanomzelllinie Mel Ju reexprimiert wurde und nach einer AGO1 Immunopräzipitation die an den RISC gebundene RNA durch eine cDNA Array Analyse quantifiziert wurde. Dabei war nach der AGO2 Reexpression ein deutlicher Anstieg der an den AGO1 basierten RISC gebundenen AGO2 mRNA zu messen (Abbildung III-21 A). Die Genexpressionstranskripte der übrigen Argonaut Proteine (AGO1, AGO3 und AGO4) konnten hingegen nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis demonstriert die posttranskriptionale Hemmung von AGO2 durch miRNAs. Zur Verifikation der AGO2 Regulation durch miRNAs wurden aus Mel Ju und Mel Im Proteinlysaten (RIPAs) eine Kontroll- (ctrl.-IP), AGO1- (AGO1-IP) und AGO2- (AGO2-IP) Co-Immunoprezipitationen durchgeführt und die gebundenen mRNAs analysiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass das AGO2 Gentranskript in Mel Ju Zellen zu 16 % assoziiert am AGO1 basierten RISC und zu 44 % assoziiert am AGO2 basierten RISC vorliegt. In der Melanomzelllinie Mel Im sind ca. 17 % bzw. 19 % des AGO2 Gentranskriptes am AGO1 bzw. AGO2 basiertem RISC assoziiert (Abbildung III-21 B). Dieses Ergebnis bestätigt die Regulation von AGO2 durch miRNAs. Zudem konnte die Regulation des AGO2 Gentranskriptes sowohl am AGO1 als auch am AGO2 basiertem RISC nachgewiesen werden.

9.2 MÖGLICHE AGO2 REGULIERENDE MIRNAS?

Durch das online verfügbare Computer-Programm miRWALK der Universität Heidelberg (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>) wurden miRNAs, die zu einer potentiellen Bindung an das AGO2 Gentranskript befähigt sind vorhergesagt. Dabei wurden nur miRNAs berücksichtigt, die eine Bindung in der kodierenden Region der AGO2 mRNA aufweisen, und nicht in der 3' oder 5' UTR. Die Fokussierung der Suche nach der AGO2 regulierenden miRNA auf den kodierenden Bereich der AGO2 mRNA ist begründet durch die reprimierte Expression von rekombinanten AGO2 in Melanomzellen. Das Expressionsplasmid, welches für die AGO2 Reexpression in Melanomzellen verwendet wurde, enthält ausschließlich die kodierende Sequenz von AGO2. Somit kann die 3' und 5' UTR der AGO2 mRNA als Binderegion für die AGO2 reprimierende miRNA im Melanom ausgeschlossen werden.

Zur Überprüfung des Einflusses einer vorhergesagten miRNA auf AGO2 wurde die jeweilige miRNA Bindestelle in dem pAGO2 Expressionskonstrukt durch zwei stumme Punkt-Mutationen so verändert, dass die jeweiligen miRNAs nicht mehr binden können. Anschließend wurde eine AGO2 Reexpression durch die pAGO2-Mutationsplasmide in der Melanomzelllinie Mel Ju durchgeführt und die Menge an exprimiertem AGO2 durch eine Western Blot Analyse mit zugehöriger Quantifikation nach 24 Stunden bestimmt (Abbildung III-22).

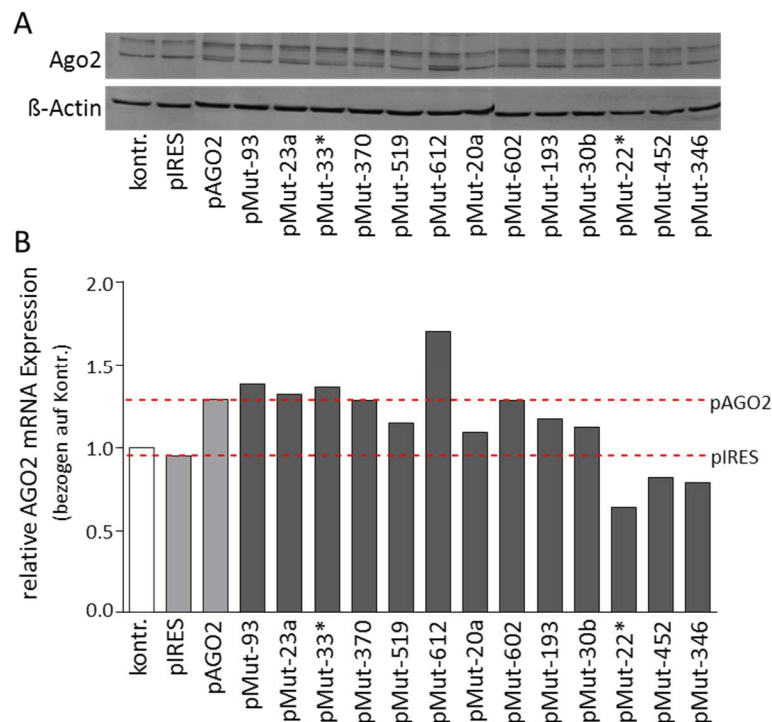


Abbildung III-22: Suche nach möglichen AGO2 regulierenden miRNAs. (A) AGO2 Western Blot Analyse mit zugehöriger (B) AGO2 Western Blot Quantifikation der endogenen und exogenen AGO2 Proteinexpression. Analysiert wurde die Expressionsstärke der verschiedenen AGO2-Mutationsplasmide (pMut) zur Identifikation von AGO2 regulierenden miRNAs im Melanom. Bestimmt wurde der Status der AGO2 Expression in unbehandelten (kontr.), sowie mit pIRES oder pAGO2 transfizierten Mel Juso Zellen als Referenz für die AGO2 Expression. Die Mengen an AGO2 der AGO2-Mutationsplasmid transfizierten Mel Juso Zellen wurde ebenfalls bestimmt und zeigen eine leicht erhöhte AGO2 Expression bei den pMut-612 transfizierten Zellen.

Im Vergleich zu den unbehandelten (kontr.) und den mit dem Leerplasmid (2 µg pIRES) transfizierten Mel Juso Zellen, ist die AGO2 Proteinexpression in den Zellen die mit 2 µg pAGO2 transfiziert wurden deutlich erhöht. Dies ist an der Zunahme der kleineren der beiden AGO2 Banden erkennbar, da das von dem Expressionskonstrukt translatierte AGO2 eine N-terminale Flag- und NH-Modifikation aufweist. Trotzdem wurde die Gesamtmenge, bestehend aus exogener und endogener AGO2 Proteinexpression, an AGO2 durch die AGO2 Western Blot Quantifikation bestimmt. Es zeigt sich, dass fast alle mit 2 µg Mutationsplasmid transfizierten Mel Juso Zellen einen AGO2 Status aufweisen, der dem AGO2 Status der mit 2 µg pAGO2 transfizierten Zellen entspricht. Die AGO2 Proteinexpression der Zellen, die mit den Mutationsplasmiden pMut-22*, pMut-452 und pMut-346 transfiziert wurden, erreichen nicht das Expressionsniveau wie die Zellen, die mit pAGO2 transfiziert wurden. Dies könnte durch eine Mutation im Expressionsplasmid verursacht worden sein. Es wurden zwar alle gerichteten Mutagenesen

mittels einer Sequenzierung überprüft, jedoch erfolgte keine vollständige Sequenzierung der Plasmide. Das AGO Mutationsplasmid der miRNA-612 (pMut-612) führt hingegen zu einer gesteigerten AGO2 Expression. Dies lässt eine AGO2 Regulation durch die miRNA-612 vermuten, die im Folgenden näher charakterisiert werden soll.

Für den Nachweis der AGO2 Regulation durch miRNA-612 wurden Melanomzellen mit einem miR-612-Inhibitor behandelt, um die negative Regulation der miRNA zu unterbinden und die Interaktion durch einen AGO2 Anstieg nachzuweisen. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung III-23 A dargestellt.

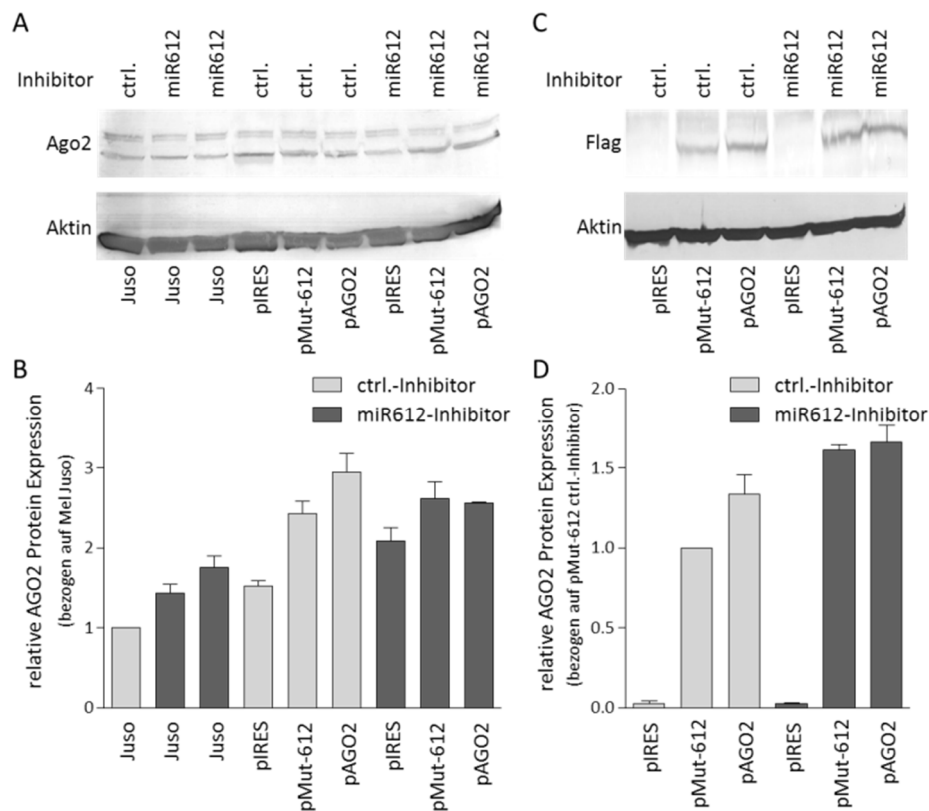


Abbildung III-23: Nachweis der AGO2 Regulation durch miRNA-612. (A) AGO2 und (C) Flag-Western Blot Analysen mit jeweils zugehörigen Quantifikationen (B und D) zur Bestimmung der AGO2 Expression nach miRNA-612-Inhibitor Behandlung im Melanom. Der AGO2 Status steigt bei miRNA-612-Inhibitor behandelten im Vergleich zu kontrollbehandelten (ctrl. Inhibitor) Mel Juso Zellen nur geringfügig an. Es ist keine AGO2 Expressionssteigerung nach 2 µg pAGO2 oder 2 µg pMut-612 Transfektion und nach miRNA-612-Inhibitor Behandlung im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen detektierbar. Auch die plasmidbasierte AGO2 Expression, welche durch die Flag Modifikation von der endogenen unterscheidbar ist, zeigt keinen signifikanten Anstieg nach miRNA-612 Inhibitorbehandlung im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen.

Der AGO2 Western Blot (Abbildung III-23 A) mit der zugehörigen AGO2 Western Blot Quantifikationen (Abbildung III-23 B) zeigen, dass das AGO2 Expressionsniveau nach der

Behandlung mit dem miRNA-612-Inhibitor in Mel Juso Zellen auf das 1,3 bzw. 1,7 fache der kontrollbehandelten Zellen ansteigt. Auch nach einer pIRES Transfektion als Kontrollbehandlung zur AGO2 Reexpression zeigt sich ein leichter Anstieg der AGO2 Expression nach der miRNA-612 Inhibitorbehandlung. Jedoch ist die miRNA-612 trotzdem nicht die Ursache für die AGO2 Repression im Melanom. Dies ist daran zu erkennen, dass die Mel Juso Zellen nach einer Behandlung mit einem miRNA-612-Inhibitor und einer vorheriger AGO2 Reexpression keine AGO2 Expressionssteigerung aufweisen im Vergleich zu AGO2-reexprimierten Zellen die mit einem Kontrollinhibitor behandelt wurden. Zudem ist auch keine Steigerung der AGO2 Konzentration in Zellen erkennbar, die mit dem Kontrollinhibitor und 2 µg pMut-612 behandelt wurden im Vergleich zu Zellen die mit dem Kontrollinhibitor und 2 µg pAGO2 behandelt wurden.

Der Flag Western Blot (Abbildung III-23 C) mit der zugehörigen Flag Western Blot Quantifikation (Abbildung III-23 D) analysiert ausschließlich die Plasmid-basierte AGO2 Proteinexpression, da das endogene AGO2 keine Flag-Modifikation aufweist. Es zeigt sich, dass nach miRNA-612-Inhibitorbehandlung die AGO2 Expression etwas höher ist als in den Kontrollinhibitor behandelten Zellen. Diese zeigen jedoch bei 2 µg pMut-612 Transfektion einen geringeren AGO2 Status als die mit pAGO2 transfizierten Zellen, was ebenfalls eine Regulation von AGO2 durch die miRNA-612 widerlegt.

10 LOKALISATION DER ARGONAUT PROTEINE

Die Lokalisation von AGO2 beschränkt sich nicht nur auf das Zytoplasma. Einige Studien konnten AGO2 bereits im Zellkern nachweisen (Rudel *et al.* 2008; Kim *et al.* 2011). Durch AGO2 Immunfluoreszenz Analysen wurde nun überprüft, ob dies auch für das Melanom zutreffend ist, oder ob sich aufgrund der bereits festgestellten AGO2 Reduktion im Melanom Unterschiede in der AGO2 Lokalisation ergeben.

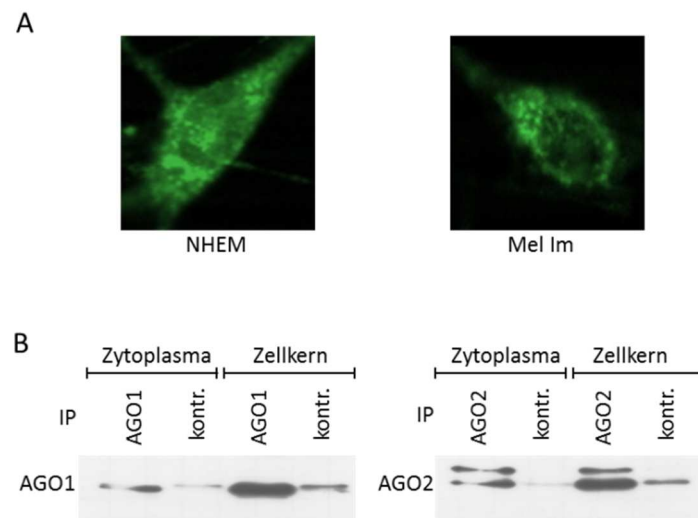


Abbildung III-24: Vergleich der AGO Lokalisation in Melanozyten und Melanomzellen. (A) AGO2 Immunfluoreszenz Färbungen einer Melanozyten und einer Mel Im Zelle zeigen neben der zytoplasmatischen AGO2 Expression auch ein AGO2 Expression im Zellkern. (B) AGO1 und AGO2 Western Blot Analysen von AGO1 bzw. AGO2 Co-Immunopräzipitationen aus getrennten Kern- und Zytoplasma-Fractionen von Mel Im Zellen zeigen dass AGO1 und AGO2 jeweils im Zytoplasma und Kern der Melanomzelle vorkommen.

Die AGO2 Immunfluoreszenz Färbungen in Abbildung III-24 A zeigen bei NHEM eine starke Färbung im Zytoplasma und eine etwas schwächere im Zellkern. In den Mel Im Zellen ist das AGO2 ebenfalls in beiden Kompartimenten nachweisbar, wenn auch deutlich geringer als bei den Melanozyten. Durch eine AGO1 und AGO2 Western Blot Analyse sollen beide Argonaut Proteine im Zytoplasma als auch im Kern von Melanomzellen untersucht werden. Hierfür wurden Kernpräparationen durchgeführt, bei denen die Kern-Fraktion von der Zytoplasma-Fraktion getrennt wurde. Anschließend wurde aus jeder Fraktion eine AGO1 und AGO2 Co-Immunopräzipitation durchgeführt. In Abbildung III-24 B ist zu sehen dass AGO1 und AGO2, sowohl im Melanozyten als auch in der Melanomzelle im Zytoplasma als auch im Zellkern vorkommen.

11 ZELLULÄRE BEEINFLUSSUNG VON MELANOMZELLEN DURCH EINE MODULATION VON AGO2

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass die AGO2 Reduktion einen erheblichen Einfluss auf regulatorische RNAs ausübt. Daraus ergibt sich die Frage, welche Konsequenzen für die Melanomzelle daraus resultieren. Durch cDNA Array Analysen können die Expressionen von sehr vielen Proteinen einer Zelllinie gleichzeitig bestimmt werden. Analysiert wurden die Expressionprofile von Mel Ju und Mel Im Zellen nach der AGO2 Reexpression (2 µg pAGO2) im Vergleich zu kontrollbehandelten Zellen (2 µg pIRES).

In Abbildung III-25 A sind die *Gene Ontology Terms* (GO-Terms) der durch AGO2 signifikant in Mel Im und Mel Ju Zellen regulierten Gene klassifiziert und in Abbildung III-25 B graphisch dargestellt. In der Analyse wurden nur Proteine berücksichtigt, die nach der AGO2 Reexpression mindestens eine Expressionsänderung um den doppelten Wert aufwiesen.

Die graphische Darstellung zeigt die zellulären Prozesse, die durch die AGO2 Reexpression betroffen sind und ihre Einbindung in das Netzwerk der Zelle. Der Farbcode gibt dabei wieder, wie wahrscheinlich der jeweilige Prozess durch AGO2 beeinflusst wird, d.h. wie wahrscheinlich die AGO2 regulierten Gene in den entsprechenden GO-Terms eingebunden sind.

Insgesamt wurden 2.034 Gene identifiziert, die sowohl in Mel Ju als auch in Mel Im Zellen durch AGO2 signifikant reguliert wurden. Der dabei verwendete cDNA Array (Affymetrix GeneChip® Human Gene 2.0 ST Array) analysierte dabei insgesamt die Expression von 41.777 Genen.

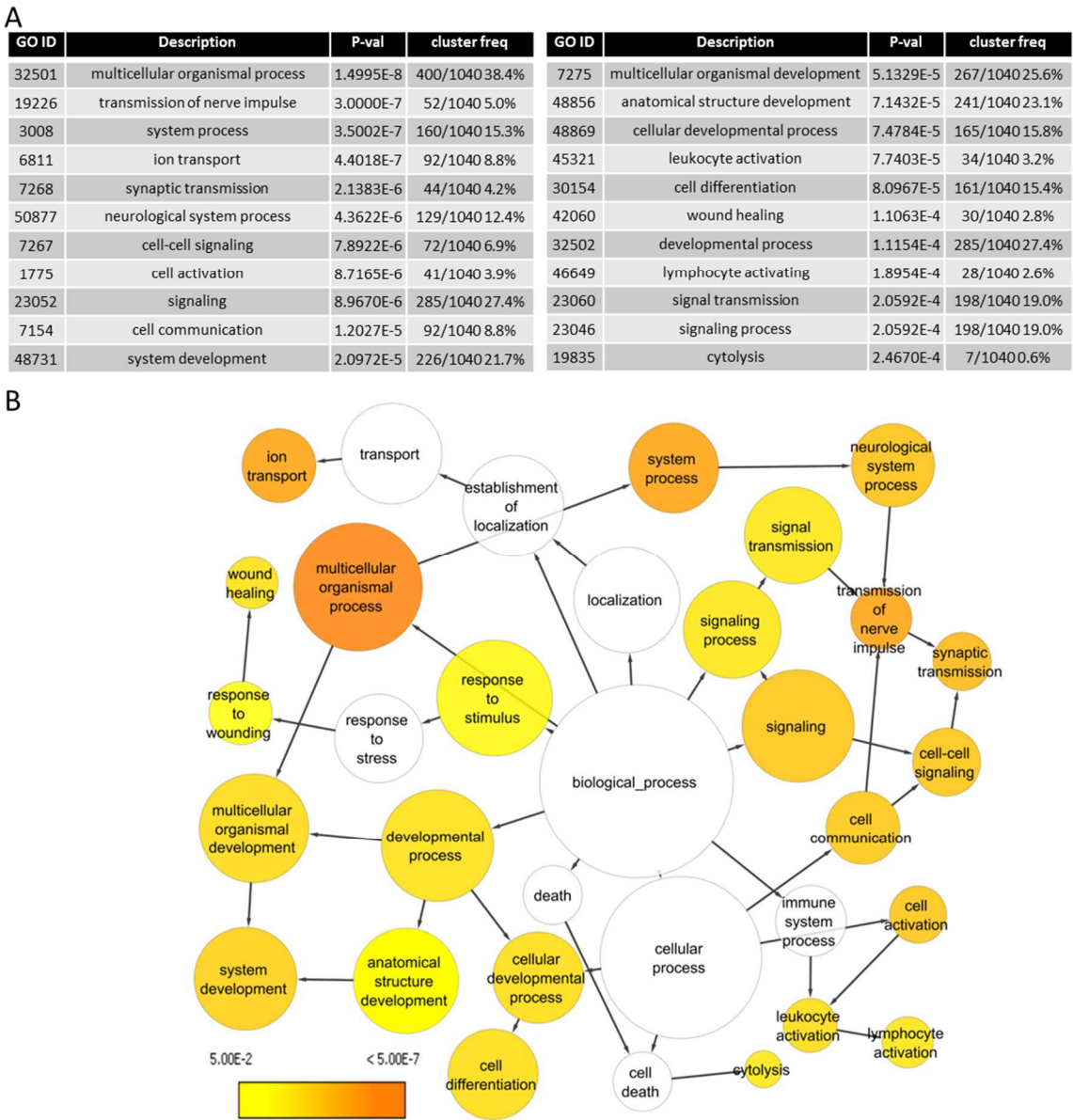


Abbildung III-25: Genexpressionsanalysen zur Bestimmung des Einflusses der AGO2 Reduktion im Melanom. (A) Aufstellung aller GO-Terms, die signifikant durch AGO2 regulierte Gene werden. Die durch AGO2 modulierten Gene wurden identifiziert, indem die Expressionsmuster von Mel Ju und Mel Im Zellen in denen jeweils AGO2 reexprimiert wurde mit kontrollbehandelten Mel Ju und Mel Im Zellen verglichen wurde. (B) Graphische Auswertung der AGO2 modulierten Zellprozesse.

12 AGO2 IST EIN REGULATOR FÜR DIE MIGRATIONSFÄHIGKEIT VON MELANOMZELLEN

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass eine fehlregulierte miRNA eine direkte phänotypische Auswirkung auf die Zelle haben kann (Braig *et al.* 2010; Dynoodt *et al.* 2013; Greenberg *et al.* 2014). Zudem erbrachte die Analyse des Expressionsprofils nach AGO2 Reexpression in Melanomzellen die Erkenntnis, dass auch Proteine, die für die Zellbewegung

wichtig sind, durch AGO2 beeinflusst werden. In der Abbildung III-26 A sind diese durch AGO2 modulierte Proteine den entsprechenden *GO-Terms* für Zellbewegung (Migration, Zell-Motilität, Zell-Lokalisation und Zell-Bewegung) zugeteilt. Zusätzlich sind für die Migration in Abbildung III-26 B die migrations-relevanten Proteine (ROCK1, CTHRC1 und CD44) mit ihren relativen Expressionswerten in Abhängigkeit von AGO2 dargestellt. Daraufhin wurde untersucht, ob die AGO2 Modulation in Melanomzellen tatsächlich eine phänotypische Auswirkung zur Folge hat. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde durch Boyden Kammer Migrations Analysen das migratorische Potential von Mel Ju Zellen in Abhängigkeit von AGO2 bestimmt.

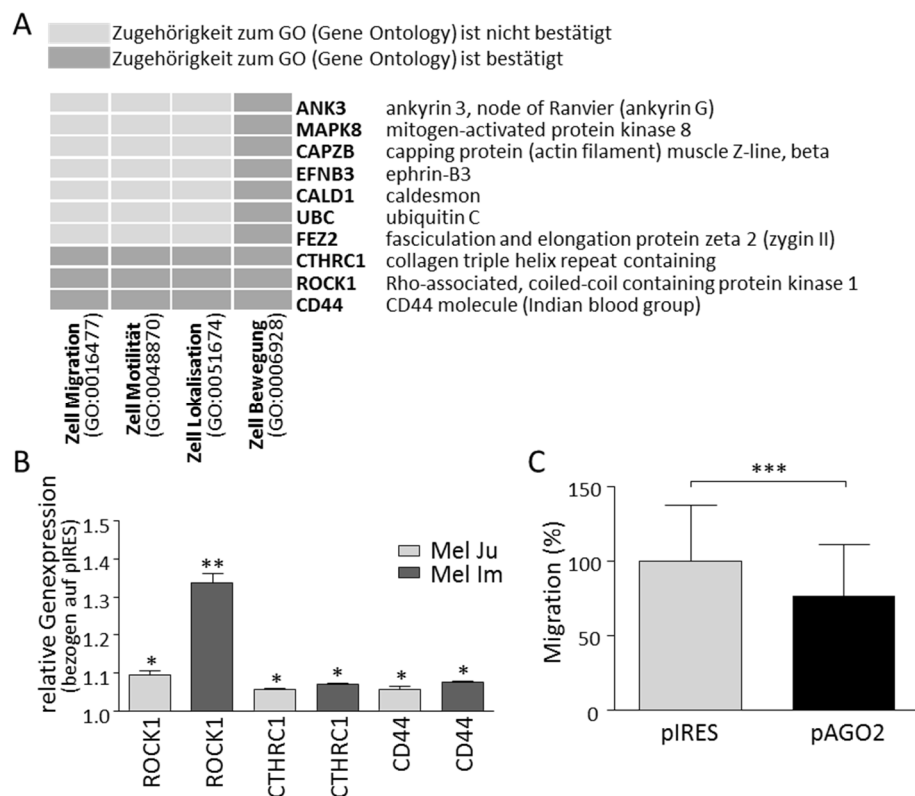


Abbildung III-26: Eine Modulation von AGO2 beeinflusst die Migrationsfähigkeit von Zellen (verändert nach Völler *et al.* (2013)). (A) Aufstellung aller Gene, die bei der Reexpression von AGO2 in Melanomzellen reguliert werden und zusätzlich eine Einstufung in Zellbewegungs relevante GO Terms (Gene Ontology Terms) aufweisen. (B) Relative Genexpression der für die Zellbewegung relevanten Gene ROCK1, CTRC1 und CD44, die bei der AGO2 Reexpression (2 µg pIRES) im Vergleich zur Kontrolle (2 µg pIRES) sowohl in Mel Ju als auch in Mel Im Zellen bestimmt wurden. (C) Boyden Kammer Analyse zur Bestimmung des migratorischen Potentials nach 2 µg pIRES oder 2 µg pAGO2 Transfektion in Mel Ju Zellen. Die AGO2 Reexpression reduziert die Migrationsfähigkeit der Zellen signifikant. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001

Die Boyden Kammer Migrations Analyse in der Abbildung III-26 C zeigt, dass durch die AGO2 Reexpression das migratorische Potential der Melanomzelllinie im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen um ca. 20 % abnimmt.

IV DISKUSSION

1 DIE miRNA PROZESSIERUNG IM MALIGNEN MELANOM

Viele Studien haben eine Fehlregulation von miRNAs als eine mögliche Ursache der malignen Transformation in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen (Tokarz und Blasiak 2012; Zhang *et al.* 2014). Auch im malignen Melanom sind miRNAs an der Entstehung und Progression des Tumors beteiligt (Bennett *et al.* 2013; Kunz 2013).

Die Prozessierung der miRNAs ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem jede einzelne Reaktion genau reguliert ist (Finnegan und Pasquinelli 2013). Schlüsselenzyme bei der miRNA Prozessierung sind die RNA Polymerase II, Drosha und sein Kofaktor DGCR8, Exportin5, DICER, TARBP und die Argonaut Proteine. Eine veränderte Genexpression einzelner Prozessierungsproteine wurde bereits in verschiedenen Tumoren beschrieben (Kim *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2014).

Auch in Bezug auf Hautkrebs haben einige Studien bereits Änderungen in der Genexpression von miRNA prozessierenden Proteinen aufgezeigt. So konnte z.B. während der Tumorentwicklung des epithelialen Hautkrebses eine Veränderung der Genexpression einzelner Prozessierungsproteine, wie DGCR8, PACT, TARBP, DICER und AGO2, aufgezeigt werden (Sand *et al.* 2012). Auch im kutanen malignen Melanom wurde eine Genexpressionsänderung von TARBP2 und AGO1 während der Tumorgenese beobachtet (Sand *et al.* 2012). In diese genannten Studie konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Genexpressionsraten der Prozessierungsproteine Dicer, Drosha, DGCR8, Exportin5, PACT, TARBP1 und AGO2 während der Tumorgenese des kutanen malignen Melanoms konstant bleiben. Auch während der Progression des Melanoms kann es zu einer Genexpressionsänderung von miRNA Prozessierungsproteinen kommen. Es konnte z.B. nachgewiesen werden, dass sich die Dicer Konzentration während der Progression des Tumors ändert. Dabei erfolgt eine Reduktion des im Zellkern befindlichen Droshas bei gleichzeitigem Anstieg der zytoplasmatischen Drosha-Konzentration (Jafarnejad *et al.* 2013). Die hier zusammengefassten Studien zeigen, dass die miRNA Prozessierungsproteine in Hautkrebserkrankungen eine veränderte Genexpression aufzeigen können.

Bisher hat jedoch noch keine Studie die Rolle der AGOs im malignen Melanom beschrieben. Um eine eventuelle Besonderheit der AGO Expression von Melanozyten aufzeigen zu können, wurden in dieser Dissertation zunächst die Genexpression der vier AGOs in Melanozyten im Vergleich zur humanen Haut analysiert. Zusätzlich wurde die AGO Expression auch im Vergleich zu anderen Geweben von gesunden Organen bestimmt. Die Genexpressionen der einzelnen AGOs zeigen in den Melanozyten, sowohl im Vergleich zur Haut als auch zu den anderen Geweben, eine sehr einheitliche Expression. Die Expressionsstärke der einzelnen AGOs untereinander ist jedoch nicht

homogen. Durch die Analyse der Genexpressionsverteilung der einzelnen AGOs konnte festgestellt werden, dass AGO1 und AGO2 die am stärksten vertretenen AGOs in den analysierten Geweben darstellen. Zudem konnte am Beispiel von adulten und fetalen Leber und Hirn Gewebeproben nachgewiesen werden, dass es während der embryonalen Entwicklung zu einer deutlichen Änderung in der AGO Genexpression kommen kann. Eine Erklärung für dieses Phänomen wurde nach dem jetzigen Stand in der Literatur noch nicht beschrieben. Es ist lediglich bekannt, dass AGO2 im Vergleich zu den anderen AGOs in der Embryogenese essentiell ist (Liu *et al.* 2004).

Auch der separate Vergleich der Expressionswerte der vier AGOs aus Melanozyten mit der Expression in verschiedenen Melanomzelllinien zeigte ein einheitliches Expressionsbild für jedes AGO. Sand *et al.* postulierten eine Änderung der AGO1 Genexpression während der Tumorgenese des kutanen malignen Melanoms (Sand *et al.* 2012). In dieser Studie wurde ein signifikanter Anstieg der AGO1 Genexpression vom melanozytären Nävus zur Metastase festgestellt. Jedoch zeigte sich keine signifikante Änderung der AGO1 Genexpression zwischen dem Primärtumor und den Metastasen. Auch die AGO1 Genexpressionsanalyse der in dieser Dissertation analysierten Melanomzelllinien zeigte keinen Unterschied zwischen den Primärtumorzelllinien und den Metastasenzelllinien, was in Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Sand *et al.* ist. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden kultivierte NHEMs als Referenz für benigne Melanozyten vermessen. In der Studie von Sand *et al.* wurden hingegen alle Zellen aus melanozytären Nävi als Referenzgewebe der Tumorgenese verwendet. Diese Gewebe enthält neben Melanozyten auch andere Zelltypen der Haut, vorwiegend Keratinozyten. Durch die verschiedenen Referenzen, NHEMs gegenüber melanozytärem Nävi, sind die abweichenden Ergebnisse bezüglich der Änderung der AGO1 Genexpression in der Tumorgenese möglicherweise zu erklären.

Die Genexpressionsanalysen der AGOs zeigen keine differenzielle Expression in den NHEMs und den Melanomzelllinien. Daher wurde die Proteinexpression der AGOs bestimmt. Es zeigte sich, dass eine starke Diskrepanz zwischen der AGO Genexpression und der AGO Proteinexpression im malignen Melanom existiert. Für AGO2 konnte erstmalig in dieser Arbeit eine sehr starke und signifikante Reduktion in allen analysierten Melanomzelllinien (Mel Ju, Mel Im, Mel Ei und Mel Juso) gegenüber Melanozyten beobachtet werden. Dieses Erkenntnis wurde sowohl durch Western Blot als auch durch Immunfluoreszenz Analysen gewonnen. Zudem konnte festgestellt werden, dass in den Metastasenzelllinien (Mel Ju und Mel Im) eine stärkere Reduktion der AGO2 Konzentration vorliegt als in den Zelllinien aus Primärtumoren (Mel Ei und Mel Juso).

Die gewonnenen Zellkulturergebnisse wurden durch die Bestimmung der AGO2 Proteinexpression in Gewebeproben von Melanompatienten verifiziert. Dabei war in allen analysierten Gewebeproben eine starke und signifikante AGO2 Reduktion im Vergleich zu Melanozyten erkennbar. Jedoch konnte in den Gewebeproben der Effekt der stärkeren AGO2 Reduktion in Metastasen gegenüber Primärtumoren nicht bestätigt werden (Völler *et al.* 2013).

Trotz positiver AGO3 und AGO4 Western Blot Etablierung konnte die Expression dieser beiden AGOs in Melanomzellen nicht bestimmt werden. Dies liegt daran, dass die Sensitivität der AGO3 und AGO4 Western Blot Analysen nicht ausreichend für die geringe AGO3 und AGO4 Proteinexpression ist. Dass die Expression von AGO3 und AGO4 weniger stark ausgeprägt ist, als von AGO1 und AGO2, konnte auch in einer anderen Studie bereits beobachtet werden (Valdmanis *et al.* 2012). Wang *et al.* konnten zwar nachweisen, dass in der Haut AGO2 mit der 8,5 fachen und AGO1 mit der 3,8 fachen Menge an miRNAs interagieren, als dies bei AGO3 der Fall ist. AGO4 wurde in dieser Studie hingegen nicht berücksichtigt (Wang *et al.* 2012). Jedoch ist diese Verteilung der miRNAs auf ein bestimmtes AGO Protein ausschließlich geprägt von der relativen Häufigkeit der AGOs zueinander. Dies basiert darauf, dass die prinzipielle Zuteilung der miRNAs auf die einzelnen AGO Proteine zufällig erfolgt, d.h. ohne miRNA spezifische AGO Präferenz (Liu *et al.* 2004; Meister *et al.* 2004).

Zusätzlich zu Western Blot und Immunfluoreszenz Analysen können die absoluten Mengen der jeweiligen AGO Proteine einer Zelllinie durch die massenspektrometrische *AGO-affinity purification by peptides* Methode exakt quantifiziert werden. Diese Methode war jedoch nicht geeignet für die Bestimmung des AGO Status von Melanozyten. Die Ursache liegt darin, dass die erforderliche Zellzahl zum Erlangen der notwendigen Proteinmenge für die AGO-APP-Analyse nur durch häufiges Passagieren der NHEMs erreicht werden kann. Jedoch zeigen NHEMs mit zunehmender Kultivierungsdauer verstärkt Tumoreigenschaften (Schiffner 2012). Für eine Analyse der verschiedenen AGO Proteine in Melanomzellen ist die AGO-APP Methode jedoch bestens geeignet. Die Quantifizierung ergab eine jeweilig einheitliche Verteilung der einzelnen AGOs innerhalb der analysierten Melanomzelllinien. Dabei bestätigte sich zudem, dass die Konzentration von AGO1 und AGO2 sehr viel größer ist als von AGO3 und AGO4. Aufgrund des nicht möglichen direkten Abgleichs der AGO Proteinexpression der Tumorzelllinien mit den Melanozyten, wurde der AGO Status der Melanomzelllinien mit anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien verglichen. Dabei zeigte sich, dass alle Melanomzelllinien eine generelle Reduktion der Gesamtproteinmenge an AGOs im Vergleich zu den „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien aufweisen. Eine signifikante Reduktion konnte jedoch nur für AGO2 beobachtet werden.

Die „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien zeigen im Gegensatz zu den Melanomzelllinien keine einheitlich gleiche Expressionsstärke der einzelnen AGO Proteine, was auf eine zellspezifische AGO Expressionsverteilung hindeutet. Zhang *et al.* veröffentlichten eine Studie, in der sie eine Reduktion der miRNA-99a nachweisen konnten, die ursächlich für eine Hochregulation von AGO2 im hepatozellulären Karzinom (HCC) ist (Zhang *et al.* 2014). Die gesteigerte AGO2 Proteinexpression in den HCC Zelllinien Hep3b und HepG2 konnte in dieser Dissertation verifiziert werden. Hep3b zeigte jedoch nur eine leichte und nicht signifikante Steigerung der AGO2 Genexpression und HepG2 sogar eine geringfügige Verringerung der AGO2 Genexpression. Die Diskrepanz der Genexpression zur Proteinexpression von AGO2 lässt daher ebenfalls eine post-transkriptionelle Regulation von AGO2 vermuten.

Alle vier humanen AGO Proteine sind zur Inhibition der Translation befähigt. Die nicht restriktionsfähigen AGO Proteine (AGO1, AGO3 und AGO4) können die Translation jedoch nur sterisch inhibieren. Für eine Degradation des zu inhibierenden Gentranskriptes benötigen diese AGO Proteine Unterstützung von Interaktionspartnern. Diese Funktion übernehmen die GW182 Proteine, die weitere Proteine rekrutieren und so befähigt sind die mRNA abzubauen. Zu den GW182 Interaktionspartner zählen beispielsweise poly(A)-Bindproteinen (PABPC1) und die Deadenylasen PAN2/3 bzw. CCR4/NOT (Pfaff und Meister 2013). Eine Interaktion der GW182 Proteine wurde bereits mit allen vier humanen AGO Proteinen nachgewiesen (Meister *et al.* 2005; Pfaff *et al.* 2013). In der Theorie könnte die melanomspezifische Reduktion des restriktionsaktiven AGO2 Proteins daher durch eine gesteigerte GW182 Expression kompensiert werden. Diese GW182 Expressionsteigerung könnte dazu führen, dass die zu inhibierende mRNA auch durch ein nicht restriktionsfähiges AGO Protein schneller degradiert wird. Hierfür wäre eine Konzentrationssteigerung der dafür essentiellen GW182 Proteine nötig. Um diese Theorie zu prüfen, wurde die Expression des humanen GW182 Proteins *trinucleotide repeat containing 6* (TNRC6A) analysiert. Es konnte jedoch kein TNRC6A Expressionsunterschied zwischen den NHEMs und den Melanomzelllinien aus Primärtumor und Metastasen nachgewiesen werden. Auch eine experimentelle Modulation der AGO2 Konzentration in Melanomzellen hat keine Auswirkung auf die Expression der TNRC6 Proteine (TNRC6 A-C). Somit kann ausgeschlossen werden, dass es zu einer Kompensation der AGO2 Reduktion basierten verringerten mRNA-Restriktionsfähigkeit in Melanomzellen kommt.

Eine weitere Funktion der GW182 Proteine ist der Transport der AGO Proteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern (Nishi *et al.* 2013). Die in dieser Arbeit durchgeführten AGO2 Immunfluoreszenz-Färbungen zeigen, dass die Expression von AGO2 in Melanomzellen auch im Zellkern nachgewiesen werden kann. Jedoch zeigt sich auch hier, analog dem Zytoplasma, eine

Reduktion der AGO2 Expression. Durch AGO1 und AGO2 Co-Immunopräzipitationen aus separierten Kernprotein- und Zytoplasmafraktionen konnten beide Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachweisen werden. Mit Hilfe dieser Analysemethode ist es jedoch nicht möglich, die Mengenverhältnisse zu quantifizieren, da die AGO1 und AGO2 Antikörper keine gleiche Bindungsaffinität gegenüber ihren Zielproteinen aufweisen.

Im ersten Schwerpunkt dieser Arbeit wurde zusammenfassend festgestellt, dass es im Melanom, bezogen auf Melanozyten und „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien, zu einer generellen Reduktion der miRNA prozessierenden AGO Proteine kommt, wobei die stärkste Reduktion auf das Protein AGO2 entfällt.

2 URSACHE DER AGO REDUKTION IM MALIGNEN MELANOM

Ein zentrales Dogma der Molekularbiologie wurde 1958 von Francis Crick publiziert und beschreibt den Weg der Prozessierung von der DNA über die RNA zum Protein. Dabei kann sowohl der transkriptionale (DNA – RNA) als auch der translationale (RNA – Protein) Schritt reguliert werden. Eine post-transkriptionale Regulation eines Proteins würde demnach durch eine RNA basierte Analysemethode nicht nachweisbar sein.

Alle vier Argonaut-Gene haben sich aus einem gemeinsamen Ursprungsgen entwickelt (Sasaki *et al.* 2003). Jedoch sind nur AGO1, AGO3 und AGO4 als im Tandem angeordnete Kopien auf dem Chromosom 1p34.3 lokalisiert, wohingegen das Gen für AGO2 auf dem Chromosom 8q24.3 isoliert vorliegt (Valdmanis *et al.* 2012). Diese Besonderheit der getrennten Lokalisation der AGO Proteine im Genom, kann jedoch als Ursache für die starke AGO2 Reduktion ausgeschlossen werden. Da die Genexpression von AGO2 keinen Unterschied zwischen den Melanozyten und den Melanomzellen erkennen lässt, muss es sich bei der AGO2 Reduktion im Melanom um eine post-transkriptionale Regulation handeln. Es könnten z.B. ein selektiver proteasomaler Proteinabbau durch eine Ubiquitinierung oder Sumoylierung, eine Regulation durch miRNAs, eine selektive Autophagie oder eine Glykosylierung in Frage kommen.

Es wurde bereits beschrieben, dass die E3 Ligase Trim71 für die Ubiquitinierung von AGO2 verantwortlich ist und somit auch für dessen Stabilität (Rybak *et al.* 2009). Trim71 ist auch unter dem Namen Lin-41 bekannt. Da der Zusammenhang zwischen Trim71 und der AGO2 Stabilität bereits hergestellt wurde, erfolgte im Rahmen dieser Dissertation zunächst die Untersuchung der Trim71 Expression im Melanom. Die Analyse der Trim71 Expression in verschiedenen Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten zeigte, dass diese in den Melanomzellen nicht gesteigert vorliegt. Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn eine gesteigerte Ubiquitinierung für die AGO2 Reduktion im Melanom verantwortlich gewesen wäre. Darüber hinaus zeigte sich kein

Unterschied zwischen den Primärtumor- und Metastasenzelllinien. Dies wäre ebenfalls zu erwarten gewesen, wenn Trim71 die Ursache der AGO2 Reduktion im Melanom wäre, da die AGO2 Reduktion in den Metastasenzelllinien stärker ist als in den Primärtumorzelllinien. Auch konnte durch die Analyse der Trim71 Expression in verschiedenen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien kein direkter Bezug zum AGO2 Status der jeweiligen Zelllinie abgeleitet werden.

Im Leberzellkarzinom (HCC) wurde eine starke Trim71 (Lin-41) Expression und dazu invers korrelierende AGO1 und AGO2 Expressionen festgestellt. Als direkte Konsequenz dieses Phänomens wurde eine gesteigerte Tumorgenese beschrieben (Chen *et al.* 2013). Auch in dieser Dissertation konnte eine hohe Trim71 Genexpression in den HCC Zelllinien HepG2 und Hep3b nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich keine reduzierten AGO1 und AGO2 Expressionswerte im Vergleich zu Melanozyten und anderen Tumorzelllinien. Da kein ungeschädigtes Lebergewebe als Kontrolle für die Lin-41 basierte AGO2 Reduktion in den HCC Zelllinien HepG2 und Hep3b in dieser Arbeit verwendet wurde, kann die AGO2 Reduktion im HCC nicht verifiziert werden.

Um unabhängig von der Ubiquitinierung das Proteasom-System als denkbare Ursache für die AGO2 Reduktion zu analysieren, wurde der Proteasominhibitor MG132 bezüglich eines möglichen Einflusses auf die AGO2 Expression untersucht. Nach dieser Behandlung war keine gesteigerte AGO2 Expression nachweisbar. Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass das Proteasom nicht für die AGO2 Reduktion im malignen Melanom verantwortlich ist.

Nachdem das Proteasom System als Ursache der AGO2 Reduktion im Melanom ausgeschlossen wurden, erfolgte eine Analyse weiterer posttranskriptionaler Regulationsmechanismen bezüglich ihrem möglichen Einfluss auf AGO2. Da Schätzungen zufolge ca. 30 % aller Gene durch miRNAs reguliert werden (Filipowicz *et al.* 2008), wurde der Fokus der Untersuchungen auf eine AGO2 Regulation durch miRNAs gelegt. Dass miRNA-Prozessierungsproteine selbst durch miRNAs reguliert werden, wurde in verschiedenen Tumoren bereits nachgewiesen. Dicer wird z.B. durch die miRNA-103 (Geng *et al.* 2014) und Drosha durch die miRNA-27b (Yuan *et al.* 2013) reguliert. Der direkte Zusammenhang der AGO2 Expression mit zwei verschiedenen miRNAs, der miRNA-99a (Zhang *et al.* 2014) und miRNA-100 (Wang *et al.* 2014), konnte ebenfalls bereits nachgewiesen werden. Jedoch zeigen beide miRNAs keine verstärkte Expression im Melanom (Mueller und Bosserhoff 2009) und können somit nicht für die melanomspezifische AGO2 Reduktion verantwortlich sein.

In dieser Dissertation konnte erstmalig der Nachweis erbracht werden, dass miRNAs für die AGO2 Reduktion im Melanom verantwortlich sind. Dabei wurde durch eine AGO2 Co-Immunopräzipitation mit anschließender Analyse der gebunden RNA festgestellt, dass das Gentranskript von AGO2 in Melanomzellen am RISC assoziiert vorliegt. Diese Interaktion ist nur

durch eine miRNA basierte Regulation von AGO2 erklärbar. Zudem steigt die Menge der AGO2 mRNA am RISC nach einer AGO2 Reexpression in Melanomzellen an. Dies beweist ebenfalls die miRNA basierte Regulation von AGO2 und dass dieser post-transkriptionale Mechanismus verantwortlich ist für die generelle AGO2 Reduktion im Melanom.

Es konnte zudem die Binderegion, der für die AGO2 Reduktion verantwortlichen miRNA, auf die kodierende Region des AGO2 Gentranskriptes eingegrenzt werden. Dies ist möglich, da das bei der AGO2 Reexpression verwendete Expressionsplasmid ausschließlich die kodierende Sequenz von AGO2 beinhaltet. Nach der Transfektion des AGO2 Expressionsplasids kommt es zu einem Anstieg der AGO2 mRNA am RISC. Dies ist nur erklärbar, wenn die miRNA Repression in der kodierenden Sequenz von AGO2 erfolgt.

Für die Suche nach der AGO2 regulierenden miRNA wurden durch *in silico* Analysen miRNAs ausgewählt, die sich durch eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit einer Bindung an die AGO2 mRNA auszeichnen. Dabei wurden nur miRNAs berücksichtigt, für die eine Bindung in der kodierenden Sequenz von AGO2 vorhergesagt wurde. Anschließend wurde für jede miRNA ein Reporterplasmid zur Untersuchung der miRNA auf eine AGO2 Repression hergestellt. In den Reporterplasmiden wurde die jeweils errechnete Bindesequenz einer miRNA in der AGO2 Expressionssequenz durch zwei stumme Mutationen eliminiert. Die Analyse zur Bestimmung des Einflusses einer miRNA auf die AGO2 Expression in Melanomzellen ergab, dass keine der analysierten miRNAs für die AGO2 Reduktion in Melanomzellen verantwortlich ist. Dies könnte entweder bedeuten, dass die gesuchte miRNA nicht in der miRNA Auswahl enthalten war oder dass mehr als eine miRNA für die AGO2 Reduktion verantwortlich ist. Für eine Identifizierung von zwei miRNAs die zeitgleich für die Repression von AGO2 verantwortlich sind erhöht sich bei 13 potentiellen miRNAs die Anzahl der nötigen Reporterplasmide auf 156. Da dies einen erheblichen Arbeitsaufwand mit ungewissem Ausgang bedeutet, muss für weitergehende Analysen nach alternativen Lösungswegen gesucht werden.

Neue *deep sequencing*-Analysen von miRNA Expressionsprofilen aus Melanozyten und aus Melanomzelllinien oder evtl. aus Melanomgeweben könnten helfen miRNAs zu identifizieren, die in der Entstehung und Progression des Melanoms involviert sind. Dies könnte die Suche nach der miRNA die für die AGO2 Reduktion im Melanom verantwortlich ist vereinfachen.

3 KONSEQUENZEN DER AGO2 REDUKTION FÜR DAS MALIGNE MELANOM

Die festgestellte AGO2 Reduktion im Melanom führte zu der Frage nach den daraus resultierenden Konsequenzen für die Melanomzellen. Durch viele Expressionsanalysen wurden die Expressionsprofile von miRNAs in den verschiedensten Krankheiten bestimmt (Maqbool und

Hussain 2014). Dabei sind Krebserkrankungen wie das maligne Melanom nicht ausgenommen worden (Calin und Croce 2006; Mueller *et al.* 2009). In den Expressionsprofilen von „nicht-Melanom“ Tumoren wurde meist eine Verringerung der durchschnittlichen miRNA Expression gezeigt (Lu *et al.* 2005). Das bedeutet, dass das generelle miRNA Expressionsniveau in den Tumoren niedriger ist im Vergleich zu den jeweiligen gesunden Geweben. Dies konnte z.B. bei Lungenkrebs (Yanaihara *et al.* 2006), Brustkrebs (Guo *et al.* 2013) oder dem Glioblastom (Visani *et al.* 2014) nachgewiesen werden. Jedoch haben Studien, die das miRNA Expressionsprofil von Melanomzellen im Vergleich zu normalen Melanozyten bestimmt haben (Mueller und Bosserhoff 2009; Caramuta *et al.* 2010; Philippidou *et al.* 2010; Nazarov *et al.* 2013), eine Hochregulation des durchschnittlichen miRNA Expressionsniveaus nachgewiesen. Eine miRNA Expressionsanalyse von sieben Melanomzelllinien zeigt z.B., dass 49 miRNAs signifikant stärker exprimiert und lediglich 14 miRNAs signifikant weniger stark exprimiert waren als in Melanozyten (Mueller *et al.* 2009). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte darin liegen, dass aus der Steigerung der miRNA Genexpression in Kombination mit einer reduzierten Menge an AGO2 ein „Depot“ von miRNAs in der Melanomzelle entsteht. Dieses „miRNA-Depot“ hätte für die Melanomzelle evtl. den Vorteil schneller auf Umwelteinflüsse, wie beispielsweise bei der Invasion in andere Gewebe, reagieren zu können. Dies würde jedoch auch bedeuten, dass eine miRNA im Melanom eine geringere Wirksamkeit aufweist als in anderen „nicht-Melanom“ Zellen aufgrund der geringeren Verfügbarkeit von AGO2.

Die Theorie der geringeren Wirksamkeit von regulatorischen RNAs im Melanom wurde durch eine weitere Beobachtung gestützt. Bei experimentellen Arbeiten mit siRNAs zum spezifischen *Protein-knock-down* wurden in Melanomzellen im Vergleich zu anderen „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien höhere siRNA-Dosen benötigt. Um diese Erfahrungswerte zu quantifizieren wurde die Effektivität von regulatorischen RNAs an den Modellproteinen cJun und NRAS bestimmt. Es zeigte sich, dass in Melanomzellen die siRNAs beider Modellproteine signifikant geringere Repressionen der Proteinexpression erzielten als in „nicht-Melanom“ Tumorzelllinien. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig eine geringere Effektivität von regulatorischen RNAs in Melanomzellen nachgewiesen werden (Völler *et al.* 2013).

Um zu überprüfen, ob die Ursache der geringeren Effektivität von regulatorischen RNAs im Melanom auf AGO2 zurückzuführen ist, wurden si- und sh-RNAs auf ihre Wirksamkeit bei gleichzeitiger Modulation der AGO2 Konzentration in Melanomzellen analysiert. Die Analyse ergab, dass eine AGO2 Reexpression die Effizienz von si-RNAs um 20 % steigert im Vergleich zu kontrollbehandelten Melanomzellen. Auch die Effizienz der noch zu prozessierenden sh-RNAs steigerte sich signifikant nach einer Konzentrationserhöhung von AGO2. Somit konnte in dieser

Arbeit erstmalig belegt werden, dass die AGO2 Reduktion Ursache für die reduzierte Effektivität von siRNAs im Melanom ist (Völler *et al.* 2013).

Die AGO Reduktion im Melanom ist kein generelles Phänomen, d.h. es werden nicht alle vier AGOs in gleichen Maßen reduziert exprimiert. Im Gegensatz zu den AGOs 1, 3 und 4 erfährt nur AGO2 eine signifikante Reduktion. Diese selektive AGO Regulation erfolgt nicht zufällig, sondern beruht auf einer post-transkriptionalen Regulation durch miRNAs. Es kann daher spekuliert werden, dass die AGO2 Reduktion auch eine regulatorische Funktion für die Melanomzelle hat. Diese Funktion ist jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand noch vollständig unbekannt. Die Spekulation wird auch dadurch gestützt, dass AGO2 eine Sonderstellung innerhalb der AGO Proteinfamilie einnimmt. So ist AGO2 das einzige AGO, welches zu einer Restriktion der Ziel mRNA befähigt ist (Hauptmann und Meister 2013). Zwei weitere Charakteristika von AGO2 verdeutlichen die Sonderstellung von AGO2 innerhalb der AGO Proteinfamilie. Zum einen führt nur der Verlust von AGO2 zu einer Letalität von Mausembryonen, wohingegen der Verlust der anderen AGO Proteine ohne phänotypische Effekte bleibt (Liu *et al.* 2004). Zum anderen hat AGO2 die Fähigkeit, einen der beiden Stränge der pre-miRNA zu schneiden und die entstehende ac-pre-miRNA erst im Anschluss an DICER zu übergeben. Die genaue Funktion dieses zusätzlichen Prozessierungsschrittes ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Es wird vermutet, dass dieser Schritt der Strang-Selektion dient oder dem leichteren Entlassen des *passenger* Strangs aus dem RISC (Diederichs und Haber 2007).

Normalerweise sind miRNA basierte Effekte auf RNA-Ebene im Melanom weniger deutlich detektierbar als dies auf Protein-Ebene der Fall ist. Ein Beispiel hierfür ist die direkte Regulation des Transkriptionsfaktors cJun durch die miRNA-125b. Die miRNA-125b bindet in der kodierenden Sequenz von cJun, wobei die Inhibition der cJun Translation nur durch Proteinanalysen nachgewiesen werden kann (Kappelmann *et al.* 2013). Eine Ursache dieses Phänomens könnte die geringe Menge an AGO2 im Melanom sein. Aufgrund der geringeren AGO2 Verfügbarkeit in Melanomzellen könnte die miRNA-125b Repression von cJun vermehrt durch die nicht-restriktionsfähigen AGOs 1, 3 und 4 vollzogen werden. Die Konsequenz wäre, dass es nicht zu einem sofortigen Abbau des cJun Gentranskriptes kommt, wie es bei einer restriktionsfähigen AGO2 basierten Inhibition der Fall gewesen wäre. Durch die miRNA-125b Repression ohne Abbau des Gentranskriptes ist die cJun mRNA noch nachweisbar, obgleich die cJun Proteinexpression bereits durch ein nicht-restriktionsfähiges AGO inhibiert wurde.

Um die Auswirkung der geringen AGO2 Verfügbarkeit im Melanom näher zu charakterisieren, wurde AGO2 in die Melanomzelllinien Mel Ju und Mel Im reexprimiert. Dabei wurde ein den Melanozyten entsprechendes Niveau der AGO2 Expression erreicht. Die Analyse erfolgte durch

einen cDNA Array durch den die Genexpression von ca. 40.000 Genen bestimmt wurde. Die cDNA-Array Analyse ergab, dass ca. 2.000 Gene durch die AGO2 Modulation signifikant reguliert werden. Ca. 30 % der humanen Gene werden post-transkriptional durch miRNAs reguliert (Lewis *et al.* 2005). Das bedeutet, dass theoretisch 12.000 der 40.000 analysierten Gene einer miRNA Regulation unterliegen. Da 2.000 Gene signifikant durch AGO reguliert wurden, ergibt sich daraus eine Quote von ca. 16 %. Konsequenz der AGO2 Reexpression für die Melanomzellen ist daher, dass in ca. 16 % der miRNA Regulationen eine direkte mRNA Degradation durch AGO2 erfolgt. Diese wären vor der AGO2 Reexpression nicht detektierbar gewesen, da die Repression durch ein nicht-restriktionsfähiges AGO erfolgte oder gänzlich ausblieb. Bei der Auswertung des cDNA Arrays nach der AGO2 Modulation wurden jedoch nur die Gene berücksichtigt, deren Genexpression sich durch die AGO2 Reexpression mindestens um den doppelten Wert änderten und dies in beiden analysierten Zelllinien. Daher liegt die tatsächliche Anzahl an Genen, die durch eine Modulation von AGO2 beeinflusst werden, sehr wahrscheinlich deutlich über 16 %.

Die cDNA Analyse der AGO2 Reexpression in Melanomzellen zeigte, dass auch Gene durch AGO2 moduliert werden, die eine *GO-term*-Einstufung in Prozesse der Zellbewegung haben. Daher wurde für eine phänotypische Charakterisierung der AGO2 Reduktion das migratorische Potential von Melanomzellen analysiert. Nach der AGO2 Reexpression zeigte sich eine Verminderung der Migration von ca. 20 % im Vergleich zu den kontrollbehandelten Melanomzellen. Dieser Zusammenhang der AGO2 Verfügbarkeit zur Migration im Melanom wurde erstmalig in dieser Arbeit nachgewiesen. In anderen „nicht-Melanom“ Tumoren konnte ebenfalls beobachtet werden, dass eine Änderung der AGO2 Konzentration Einfluss auf die Migration hat. Durch AGO2-Überexpressionsversuche in Endothel-Zellen aus der Nabelschnur (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) konnte nachgewiesen werden, dass die Steigerung der AGO2 Konzentration die Migrationsfähigkeit der Zellen erhöht (Wu *et al.* 2014). In Prostata-Krebszellen konnte eine Verringerung der Migrationsfähigkeit durch eine Erniedrigung der AGO2 Konzentration detektiert werden (Wang *et al.* 2014). Beide „nicht-Melanom“ Studien zeigen eine Änderung des migratorischen Potentials durch AGO2, die nicht der Änderung in Melanomzellen entspricht. Dies kann dadurch erklärt werden, dass nicht AGO2 die Expression von migrationsrelevanten Genen direkt beeinflusst, sondern das miRNA Expressionsprofil der jeweiligen Zelle. Da das miRNA Expressionsprofil spezifisch für einen Zelltyp ist, kann sich daher auch die Modulation der AGO2 Konzentration zelltypspezifisch auf migrationsrelevante Gene auswirken.

Zusammenfassend betrachtet ist ersichtlich, dass die Konsequenzen der reduzierten AGO2 Reduktion für die Melanomzelle sehr weitreichend sind. Dazu gehört eine erhebliche

Verringerung der Wirksamkeit von regulatorischen RNAs, die Modulation einer großen Anzahl von miRNA regulierten Genen und die phänotypische Auswirkung auf das migratorische Potential der Melanomzellen.

4 BEDEUTUNG DER AGO REDUKTION FÜR EINE RNA BASIERTE THERAPIE FÜR DAS MELANOM

Es gibt prinzipiell zwei Möglichkeiten wie regulierende RNAs in der Therapie verwendet werden können: 1) Zeichnet sich die fehlregulierte miRNA in der Tumorzelle dadurch aus, dass sie eine stärkere Expression zeigt als im gesunden Gewebe, können miRNA Antagonisten das miRNA Transkript binden und durch das RNAi System eliminieren. 2) Ist die fehlregulierte miRNA in ihrer Expression unterdrückt, können miRNA *Mimics* die reduziert exprimierte miRNA ersetzen und können eine Wirkung als Tumorsuppressor haben (Bader *et al.* 2010).

Erste Studien konnten *in vivo* das therapeutische Potential von miRNA-221 und miRNA-222 bezüglich Melanomzellen nachweisen. Die Studien zeigten, dass die Reduktion der beiden miRNAs durch antagomiRs (anti-miRs) das Tumorstadium in Mäusen reduziert (Felicetti *et al.* 2008). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass miRNA-let-7 in der *miRNA-Replacement*-Therapie verwendet werden könnte. Die Transfektion von let-7a pre-miRNAs in Melanomzellen *in vitro*, hat eine Reduktion des invasiven Potentials zur Folge (Kumar 2003; Muller und Bosserhoff 2008).

Die *miRNA-Replacement*-Therapie ist jedoch abhängig von einem funktionierenden System zur Translationsinhibition durch miRNAs und somit auch von den AGO Proteinen. Auch anti-miRs sind auf AGOs angewiesen. Anti-miRs benötigen diese jedoch nicht zur Eliminierung der miRNA, sondern binden vorrangig an miRNAs die an den AGO Proteinen komplexiert vorliegen (Hogan *et al.* 2014).

Die in dieser Dissertation nachgewiesene Reduktion der AGO2 Proteinmenge in Melanomzellen hat Auswirkungen auf die Wirksamkeit einer *miRNA-Replacement* Therapie, ebenso wie auf eine anti-miR Therapie. Diese Schlussfolgerung kann durch den Zusammenhang der geringeren AGO2 Verfügbarkeit und der daraus resultierenden geringeren Effektivität von regulatorischen RNAs im Melanom gezogen werden.

Jedes der vier humanen AGOs ist zur Inhibition der Translation befähigt. Jedoch ist die direkte mRNA Degradation dem AGO2 vorbehalten (Meister *et al.* 2004). Diese direkte Degradation durch AGO2 erfolgt immer dann, wenn die *Seed*-Sequenz der miRNA vollständig komplementär zum Gentranskript ist (Rand *et al.* 2005; Leuschner *et al.* 2006). Erstaunlicherweise erfolgt jedoch keine sequenzbezogene Diskriminierung der miRNAs für ein spezielles AGO bei der miRNA-Beladung des RISC (Meister *et al.* 2004). Somit ist die AGO2 Reduktion im Melanom vor allem für die mRNAs relevant, die eine vollständige Komplementarität gegenüber der miRNA aufweisen. Für diese

Gentranskripte würde als Folge die Wahrscheinlichkeit steigen durch ein nicht-restriktionsaktives AGO inhibiert zu werden, trotz vollständiger Sequenzübereinstimmung zur miRNA. Dies lässt schlussfolgern, dass die zellspezifische Häufigkeit der vier AGO Proteine eine Spezialisierung der Zelle für die miRNA basierte Degradation der Gentranskripte darstellt. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist dieser Ansatz jedoch nur eine Theorie und bedarf zur Bestätigung noch intensiver Forschungsarbeit.

Neuere Studien zeigen, dass neben dem *guide* auch der *passenger* Strang einer miRNA Duplex in den RISC eingebunden werden kann und dort aktiv ist. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass eine Modulation der thermodynamischen Stabilität der miRNA Duplex Enden zu einer Änderung der *guide* und *passenger* Strang Festlegung führen kann. Jedoch ist dieses Phänomen bisher nur an AGO2 beobachtet worden, wohingegen AGO3 keine Änderung der Strang Diskriminierung zulässt (Winter und Diederichs 2013). Der *passenger* Strang der von Winter *et al.* analysierten miRNA-let7a weist dabei eine starke Präferenz für eine Prozessierung durch AGO3 auf, wobei die molekularen Mechanismen dieser Selektion noch nicht vollständig verstanden sind (Winter und Diederichs 2013). Das Verständnis für die molekularen Mechanismen, sowohl bei der Festlegung einer miRNA auf ein AGO bei der Beladung des RISC, als auch zur Festlegung des *guide* und *passenger* Strangs, bedürfen noch intensiver Forschungsarbeit. Hinsichtlich einer RNA basierten Therapiemodalität könnte diese Forschung potentiell klinisch relevant werden.

Versuche und Studien mit örtlich dargereichten siRNAs, d.h. durch lokale Gabe z.B. durch eine Inhalation für das Zielorgan Lunge (Bitko *et al.* 2005) oder durch eine oberflächliche Anwendung für einen Einsatz in der Region Haut (Geusens *et al.* 2009) sind vielversprechend, jedoch nicht geeignet für einen Therapieansatz gegen ein metastasierendes Melanom. Hierfür wäre nur ein systemisch basierter siRNA Ansatz geeignet, da alle Metastasen in allen Regionen des Körpers erreicht werden müssten (Zimmermann *et al.* 2006). Ein solcher Ansatz kann nur funktionieren, wenn die therapeutische RNA ihren Wirkungsort erreicht und dort auch effektiv funktioniert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass aufgrund der AGO2 Reduktion in Melanomzellen die Effektivität von regulatorischen RNAs gesenkt ist. Für die systemische Behandlung eines Melanoms müssten daher höhere Dosen der therapeutischen RNA verabreicht werden. Um die Dosis der therapeutischen RNA in der Therapie so gering wie möglich zu halten wäre es nötig, die Effektivität der therapeutischen RNA in den Melanomzellen zu erhöhen. Dies wäre in der Theorie machbar wenn durch eine Gentherapie die AGO2 Proteinmenge in den Melanomzellen wieder gesteigert werden würde.

Bei der Gentherapie wird ein defektes oder inaktives Gen kompensiert, indem die fehlende genetische Information des Gens in die Zelle therapeutisch eingebracht wird (Misra 2013). Dabei

lässt sich zwischen dem *ex vivo*- und *in vivo*-Gentransfer unterscheiden. Der *ex vivo*-Gentransfer zeichnet sich dadurch aus, dass die Zellbehandlung ausserhalb des Körpers erfolgt und erst die erfolgreich behandelten Zellen in den Körper zurückgegeben werden. Bei dem *in vivo*-Gentransfer wird die Behandlung direkt im Körper durchgeführt (Madeddu 2005). Für eine Gentherapie zur Steigerung der AGO2 Konzentration im metastasierenden Melanom würde sich nur ein *in vivo*-Gentransfer eignen um alle Metastasenzellen zu behandeln. Jedoch zeigen die Versuche der AGO2 Reexpression im Zellkultursystem in dieser Dissertation, dass die AGO2 Proteinexpression mit den verwendeten Methoden nur sehr eingeschränkt in einer Melanomzelle gesteigert werden kann. Durch den Nachweis, dass miRNAs für die AGO2 Repression verantwortlich sind, könnte daher die Inhibition der AGO2 reprimierenden miRNA einen erfolgsversprechenderen Lösungsweg im Vergleich zur AGO2 Gentherapie darstellen. Dazu wären weitere Studien nötig um die miRNAs zu identifizieren, die für die AGO2 Reduktion in den Melanomzellen verantwortlich sind, und somit im Anschluss eine effiziente RNA basierte Therapie für das Melanom zu ermöglichen.

Zusammenfassend betrachtet hat dieser Aspekt der Arbeit gezeigt, dass eine RNA basierte Therapie prinzipiell eine Möglichkeit für eine systemische Behandlung eines metastasierenden Melanoms darstellen könnte. Die in dieser Dissertation beschriebene Reduktion von AGO2 im Melanom, mit einer darauf beruhenden gesenkten Effektivität von regulatorischen RNAs, stellt für eine RNA basierte Therapie jedoch noch eine große Hürde dar. Durch weitere Studien könnte diese Hürde vielleicht genommen werden, z.B. durch die Identifikation der miRNAs die für die AGO2 Reduktion verantwortlich sind.

V MATERIAL**1 ALLGEMEINE MATERIALIEN**

BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA	Einmalartikel für Zellkultur, Lab-Teks Objektträger für Immunfluoreszenz, Matrigel der Boydenkammer
Behrens, Hamburg	Agar für Bakterienkulturen
Bio-Rad, München	Immun-Blot™PVDF Membran, Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA	SeaKern® LE Agarose
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software
GraphPad Software Inc., San Diego, USA	GraphPad Prism 4.03 Software
Invitrogen, Carlsbad, USA	Lipofectamine LTX™ Reagent, Lipofectamine RNAiMAX™ Reagent, SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit, Ready-Load™ 100bp und 1kb DNA Ladder; Geneticin
Neuro Probe, Gaithersburg, USA	Polykarbonat-Membranen für Boydenkammer (Porengröße 8µm)
New England Biolabs, Ipswich, USA	Restriktionsendonukleasen, NEBuffer für Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Antarktische Phosphatase, NEB 10-beta Competent <i>E.coli</i>
PAA Laboratories GmbH, Dartmouth, USA	Trypsin
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Fötales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin
Pierce/Peribo Science, Bonn	BCA Protein Assay Kit
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium, Melanozyten
Qiagen, Hilden	HiSpeed™ Plasmid MIDI Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, HiPerFect Transfection Reagent, siRNAs
Roche Diagnostics, Mannheim	Taq®-DNA Polymerase, RNase A, LightCycler® Kapillaren, dN6 Primer, Polynukleotid Kinase, LightCycler® 480 SYBR Green I Master, Ethidiumbromid
Roth, Karlsruhe	Roti® Load1 4x denaturierend, reduzierend
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität, Acrylamid 40% Lösung, Bromphenolblau, BSA, Trypsin, TEMED, Ampicillin (Amp), DMSO, SDS, DTT, Tween-20, Oligonukleotide, Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM), Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Phosphate Buffered Saline (PBS)
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' Ultra-competent Cells,
Takara Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real-time)

Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA VWR, Darmstadt	Vectashield® Mounting Medium with DAPI Kaiser's Glycerin Gelatine, Schnellfärbelösungen 1, 2, 3 für Boydenkammer, 96-Well Platten für BCA-Messungen, Lab-Tek™ Chamber Slides
Whatman International Ltd., Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track-Etch Membrane
Zymed Laboratories Inc., San Francisco, USA	BCIP/NBT Substrate Kit

2 LABORGERÄTE

Soweit nicht gesondert angegeben, waren alle aufgelisteten und für diese Arbeit verwendeten Laborgeräte als Ausstattung in der AG Bosserhoff der Molekularen Pathologie Regensburg vorhanden.

<u>Autoklaven</u> Tischautoklav Modell 2540 EL Autoklav 2540 EK	Tuttnauer/Systec, Wettenberg, Germany
<u>Brutschränke</u> Zellinkubatur CO2-Auto Zero Begasungsbrutschrank BB6220 CO2-Inkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau, Germany
<u>Flüssigchromatograph</u> Ultimate 3000 nano-HPLC-system	(Funktionelle Genomik, Biopark, Regensburg) Dionex, Idstein, Germany
<u>Gelelektrophoreseapparaturen</u> Wide Mini Sub® Cell GT	Bio-Rad, München, Germany
<u>Heiz- und Kühlblöcke</u> Thermomixer 5436 Thermomixer comfort Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Germany
<u>Massenspektrometer</u> Qstar XL	(Funktionelle Genomik, Biopark, Regensburg) Applied Biosystems, Darmstadt, Germany
<u>Mikroskope</u> DM IL Type 090-135.001 Axiovert 10, Axiovert 200, Axio Imager	Leica Microsystems CMS GmbH, Bensheim, Germany Zeiss, Jena, Germany

Zeiss Z1 Fluoreszenzmikroskop	
<u>Spannungsgeräte</u>	
PowerPac Basic, PowerPac HC	Bio-Rad, München, Germany
Electrophoresis Power Supply 1001, Electrophoresis Power Supply 301	GE Healthcare Life Science, Freiburg, Germany
<u>Sterilwerkbänke</u>	
LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18	Heraeus, Hanau, Germany
<u>Thermocycler</u>	
Peltier Thermal Cycler PTC-200	MJ Research, Waltham, USA
LightCycler® II LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim
<u>Waagen</u>	
R160P, L2200S	Sartorius, Göttingen
<u>Zentrifugen</u>	
MiniSpin Plus, Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Germany
Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Germany
Tischzentrifuge	Kisker, Steinfurt
LC Carousel Centrifuge	Roche Diagnostics, Mannheim
<u>Sonstige Geräte</u>	
Nanodrop®ND-1000-UV/Vis Spektralphotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Grmany
Speedvac Concentrator SC 110	Savant, New York, USA
pH-Meter pH522	WTW, Weilheim, Germany
PRECELLYS® 24 Homogenisator	Bertin Technologies, Sceaux, Frankreich
ELISA-Reader Emax, Geldokumentationssystem 2001i	MWG Biotech, Ebersberg

3 BAKTERIEN

NEB 10-beta kompetente *Escherichia coli* (High Efficiency): Stamm K12, DH10 β TM-Derivat

4 ZELLINIEN

Name	Herkunft
Melanozyten (NHEMs)	Normale humane epidermale Melanozyten
Mel Juso	humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ei	humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
Mel Ju	humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
SkMel 3	humane Melanomzelllinie aus Lymphknotenmetastase
SkMel 28	humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
HMB2	humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
SW1353	humane Chondrosarkom Zelllinie
Jurkat	humane Leukämie Zelllinie
CaCo2	humane Colon Adenokarzinom Zelllinie
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7, humane Brust Karzinom Zelllinie
PLC	humane Hepatom Zelllinie
Hep3b	humane Hepatom Zelllinie
HepG2	humane Hepatom Zelllinie
HeLa	humane Zervixkarzinom Zelllinie

5 OLIGONUKLEOTIDE

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (München) synthetisiert und lyophilisiert geliefert. Durch Lösen der Oligonukleotide mit ddH₂O nach den Herstellerangaben wurde zunächst eine 100 µM Stammlösung hergestellt, die bei -20°C gelagert wurde. Ausgehend von der Stammlösung wurde jeweils eine 20 µM Arbeitslösung der Oligonukleotide hergestellt und für die PCR oder qRT-PCR verwendet.

5.1 PRIMER FÜR DIE GERICHTETE MUTAGENESE

Name	Sequenz	Besonderheit
miR-33*-rev	5'-GCC ACT TTT CCC AAC CCG C-3'	5' phosphoryliert
miR-33*-fwd	5'-AAT ATT CCA GCA GGC ACG AC-3'	5' phosphoryliert
miR-30b*-rev	5'-ATG GGG GTA GCG CAG AAC C-3'	5' phosphoryliert
miR-30b*-fwd	5'-CTG CCA TGT TTA CAA GTC G-3'	5' phosphoryliert
miR-346-rev	5'-GCC GCT CTC CTG CTG CAG C-3'	5' phosphoryliert
miR-346-fwd	5'-CAA ACG GTG GAG TGC ACG G-3'	5' phosphoryliert
miR-519a/b/c-rev	5'-CGC ATC GTG TAA CGC CTG C-3'	5' phosphoryliert
miR-519a/b/c-fwd	5'-CTCTCAGGGCGGCTGCCAG -3'	5' phosphoryliert
miR-653-rev	5'-AAA ACT TGC ACT TCG CAT C-3'	5' phosphoryliert
miR-653-fwd	5'-AAT ACA GAT CCA TAC GTC C-3'	5' phosphoryliert
miR-20a-rev	5'-ATG CTG GAC CAT GTG TTC C-3'	5' phosphoryliert
miR-20a-fwd	5'-TTC AAA ACA CAG ATC TTT GG-3'	5' phosphoryliert
miR-22*-rev	5'-ATT CAG GTG CCG GAA CAT G-3'	5' phosphoryliert
miR-22*-fwd	5'-AAT ACG TAT GCG GGC CTG C-3'	5' phosphoryliert
miR-23a-rev	5'-GTT GCA GAC ACG GTA CTT C-3'	5' phosphoryliert
miR-23a-fwd	5'-GTC ACC CGG CGG CCC GCC AG-3'	5' phosphoryliert
miR-30a-rev	5'-GCA TGG GAG GTG GGG GTA G-3'	5' phosphoryliert
miR-30a-fwd	5'-TTG CAA GTC GGA CAG GAG C-3'	5' phosphoryliert
miR-93-rev	5'-ATG CTG GAC CAT GTG TTC C-3'	5' phosphoryliert
miR-93-fwd	5'-TTC AAA ACA CAG ATC TTT G-3'	5' phosphoryliert
miR-219-rev	5'-ATC CGT TAA TTT TTT AAT AC-3'	5' phosphoryliert
miR-219-fwd	5'-AAC CAG ACC TCA ACC ATG ATC-3'	5' phosphoryliert
miR-193a-rev	5'-CCC TTC AGA GAC ACC GTC G-3'	5' phosphoryliert
miR-193a-fwd	5'-CAA TTC CAG CAG GTT CTC C-3'	5' phosphoryliert
miR-362-rev	5'-CTG GAT GGG GGG CGG CGG CG-3'	5' phosphoryliert
miR-362-fwd	5'-GGC TAT GCC TTCA AGCC TCC-3'	5' phosphoryliert
miR-370-rev	5'-CGG AAT GTT TCC ACT TTT CC-3'	5' phosphoryliert
miR-370-fwd	5'-GCC GGC ACG ACT GTG GAC AC-3'	5' phosphoryliert
miR-372-rev	5'-ATG CTG GAC CAT GTG TTC C-3'	5' phosphoryliert
miR-372-fwd	5'-TTC AAA ACA CAG ATC TTT GG-3'	5' phosphoryliert

miR-452*-rev	5`-TTG GAC GCA CTG CGT GGC CAT C-3`	5'phosphoryliert
miR-452*-fwd	5`-ATG AAG AAC GTG CAG AGG ACC-3`	5'phosphoryliert
miR-558-rev	5`-TTG CTC TGT GAA GGA CTT CAG-3`	5'phosphoryliert
miR-558-fwd	5`-CTG AGA AAG ATC TCG AGA GAC-3`	5'phosphoryliert
miR-602-rev	5`-CGG CGT CTT GCC GGG CAG G-3`	5'phosphoryliert
miR-602-fwd	5`-GTC TAC GCC GAG GTC AAG C-3`	5'phosphoryliert
miR-612-rev	5`-GAG CCG CCC TGA AAG TGC ATC-3`	5'phosphoryliert
miR-612-fwd	5`-CCG AGC GTC CCT TTT GAG ACG-3`	5'phosphoryliert
miR-653-rev	5`- AAAACTTGCACTTCGCATC -3`	5'phosphoryliert
miR-653-fwd	5`-AAT ACA GAT CCA TAC GTC CG-3`	5'phosphoryliert

5.2 PRIMER FÜR QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qRT-PCR)

Alle Primerpaare wurden so gewählt, dass nach Möglichkeit die optimale Annealingtemperatur bei 60 °C liegt. Die Effizienz und die Messtemperatur wurden für jedes Primerpaar gesondert bestimmt.

Gen	Name der Primer (fwd/rev)	Nukleotidsequenz (fwd/rev)
AGO1	AGO1-fwd	5'-TCG CCC TGC TAG CCA TCA GAC ATT-3'
	AGO1-rev	5'-TAC AGC GCT GCC CAG CCA CAA-3'
AGO2	AGO2-for	5'-GTC TCT GAA GGC CAG TTC CA-3'
	AGO2-rev	5'-ATA GAG GCC TCA CGG ATG G-3'
AGO3	AGO3-for	5'-ATG CAA TAT GAA ACC AGC CA-3`
	AGO3-rev	5`-CTG CCA AGC AAC TTG AGG TA-3`
AGO4	AGO4-fwd	5'-CTA GCC TGT TTCA GCC ACC TC-3'
	AGO4-rev	5'-AAG GCT CAC AAC TGA CAC CC-3'
cJun	cJun-fwd	5'-TTC CTC CCG TCC GAG AGC GG-3'
	cJun-rev	5'-TCG GCG TGG TGG TGA TGT GC-3'
Aktin	β-Aktin-fwd	5'-CTA CGT CGC CCT GGA CTT CGA GC-3'
	β-Aktin-rev	5'-GAT GGA GCC GCC GAT CCA CAC GG-3'
NRAS	NRAS-fwd	5'-ATG AGG ACA GGC GAA GGC T-3'
	NRAS-rev	5'-TGA GTC CCA TCA TCA CTG CTG-3'
TNRC6A	TNRC6A-fwd	5'-GCT CGT GCA CTT TAC ACA CA-3'
	TNRC6A-rev	5`-CTT CAC GAG GAT ACC GAG GC-3`

Trim71	Trim71-fwd	5´-GAG CTG CTG TGG AAG GTA GAA-3´
	Trim71-rev	5´-GGC CAG´TAG GAT GTC TAG CG-3

5.3 siRNA, shRNA UND MIRNA INHIBITOREN

Gen	Herkunft
si-cJun (siGenome Smart pool)	Thermo Scientific Dharmacon, Lafayette, USA
si-NRAS (FlexiTube NRAS6)	Quiagen, Venlo, Niederlande
sh-cJun (HuSH shRNA)	OriGene, Rockville, USA
anti-miR-612 (Inhibitor)	Ambion, Darmstadt, Deutschland
anti-miR-ctrl.(ctrl.-Inhibitor)	Ambion, Darmstadt, Deutschland

6 VEKTOREN

Der pIRESneo Vektor (Clontech, USA) ermöglicht unter Verwendung des Cytomegalovirus (CMV) Promotors eine hohe, konstitutive Expression per Klonierung eingefügten Gensequenzen in Säugetierzelllinien.

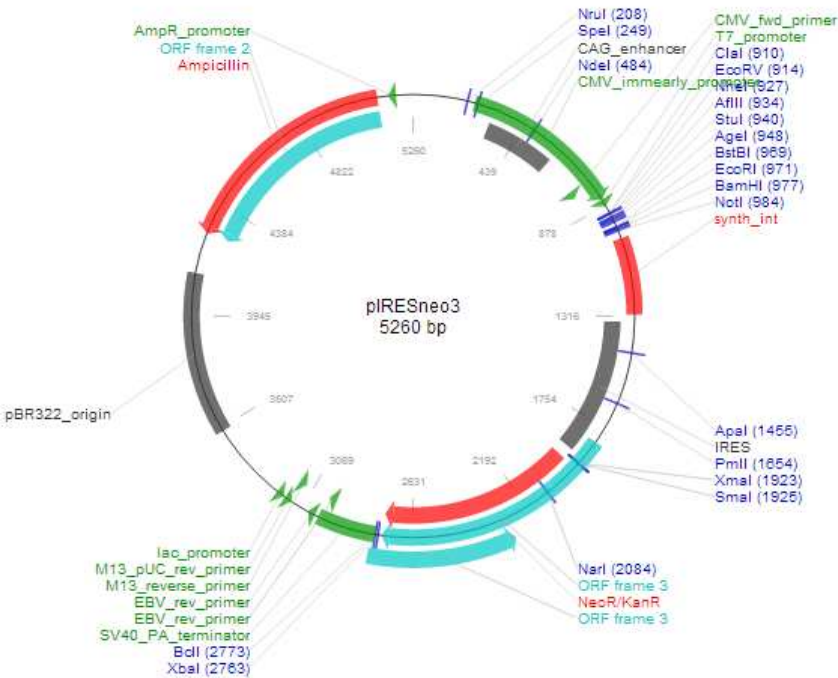


Abbildung IV-1: Vektorkarte des Expressionsvektors pIRESneo.

Name	Besonderheit
pAGO1-IRES	Plasmid Nr. 10820 (Addgenes, Cambridge, USA)
pAGO2-IRES	Plasmid Nr. 10821 (Addgenes, Cambridge, USA)
pAGO3-IRES	Plasmid Nr. 10823 (Addgenes, Cambridge, USA)
pAGO4-IRES	Plasmid Nr. 10824 (Addgenes, Cambridge, USA)
pMut-93	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-93 Bindesequenz „CACAC(C/T)TT(T/C)“
pMut-23a	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-23a Bindesequenz „GCAA(T/C)GT(G/C)A“
pMut-33*	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-33* Bindesequenz „GTGG(A/C)AA(C/T)ATT“
pMut-370	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-370 Bindesequenz „CC(A/G)GC(A/C)GGC“
pMut-519	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-519 Bindesequenz „GATGC(A/G)CT(T/C)T“
pMut-612	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-612 Bindesequenz „CT(G/C)CC(C/G)AGC“
pMut-20a	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-20a Bindesequenz „AGCA(C/T)TT(T/C)A“
pMut-602	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-602 Bindesequenz „CGCC(C/G)GT(G/C)“
pMut-193	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-193 Bindesequenz „AGG(C/G)CA(G/A)TT“
pMut-30b	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-30b Bindesequenz „CCA(C/T)CT(C/G)CCA“
pMut-22*	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-22* Bindesequenz „CTGAA(G/T)AA(C/T)“
pMut-452	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-452 Bindesequenz „GT(G/C)CA(G/A)ATGA“
pMut-346	pAGO2-IRES inklusive zweier stummer Mutationen in der miR-346 Bindesequenz „GCGG(G/C)CA(G/A)AC“

7 LÖSUNGEN

7.1 MEDIEN ZUR ANZUCHT VON *E. COLI* UND HUMANEN ZELLKULTURZELLEN

Bezeichnung	Zusammensetzung
Luria Bertani (LB) Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl +(zur Selektion Ampicillin (100 µg/ml))
LB-Medium in Petrischalen	LB-Medium + 15 g/l Agar +(zur Selektion Ampicillin (100 µg/ml))
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	DMEM 10 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin (PS)
RPMI (entwickelt im Roswell Park Memorial Institute)	RPMI 10 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin (PS)
Einfriermedium	10 % DMSO (10%) 30-40 % Panexin 50-60 % Kultivierungsmedium
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin (w/v) 0,02 % EDTA (w/v) ad PBS

7.2 LÖSUNGEN FÜR DIE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2 % (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)

DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	40 % (v/v) Saccharose 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol
Ethidiumbromidlösung	0,04 % (w/v) in ddH ₂ O

7.3 LÖSUNGEN FÜR DNA MINI-PRÄPARATION

Bezeichnung	Zusammensetzung
Solution 1	20 mM Glucose 25 mM Tris pH 8.0 10 mM EDTA
Solution 2	0,2 M NaOH 1 % SDS
Solution 3	60 % KOAc (5 M) 10% Eisessig
Ethanol/Natriumacetat-Lsg.	30 µl EtOH (100%) 1 µl NaOAc (3M)

7.4 LÖSUNGEN FÜR DIE IMMUNOPRÄZIPITATION

Bezeichnung	Zusammensetzung
IP-Waschpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.5 300 mM NaCl 5 mM Mg ₂ Cl 0.05 % Nonidet P-40
IP-Lysepuffer	20 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 0.5 % Nonidet P-40 2 mM EDTA 0.5 mM DTT 1 mM NaF

7.5 LÖSUNGEN FÜR SDS-GELELEKTROPHORESE

Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
12,5%-Trenngel	31,25 % (v/v) Acrylamid:Bis 40 % 37,5 % (v/v) Tris pH 8,8 (1 M) 0,1 % (v/v) SDS 0,05 % (v/v) APS 0,05 % (v/v) TEMED
4%-Sammelgel	10 % (v/v) Acrylamid:Bis 40 % 12 % (v/v) Tris pH 6,8 (1 M) 0,1 % (v/v) SDS 0,05 % (v/v) APS 0,05% (v/v) TEMED

7.6 LÖSUNGEN FÜR DIE AGO-AFFINITY PURIFICATION BY PEPTIDE (AGO-APP)

Bezeichnung	Zusammensetzung
NET Puffer	50 mM Tris pH7.5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5 % NP-40 10 % Glycerol 0,5 mM DTT 1 mM 4-benzensulfonylfluorid (AEBSF)
Cleavage Puffer	50 mM Tris-HCl pH7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT 1 Unit PreScission Protease "GE Healthcare Life Science"

7.7 LÖSUNGEN FÜR DIE KERN-PRÄPARATION

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer 1	10 mM Hepes pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 M DTT
Puffer 2	20 mM Hepes pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 M DTT

7.8 LÖSUNG FÜR DEN WESTERN BLOT

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blotpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8.5 190 mM Glycin 10 % Methanol

VI METHODEN

1 ALLGEMEINE METHODEN

1.1 ARBEITEN MIT *ESCHERICHIA COLI* (*E. COLI*)

1.1.1 KULTIVIERUNG VON *E. COLI*

Escherichia coli wurde in Abhängigkeit vom Verwendungszweck entweder auf festen Nährböden oder in flüssigen Schüttelkulturen kultiviert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde dem Nährmedium zusätzlich noch ein Antibiotikum (meist Ampicillin) zugesetzt. Ausplattiert wurden die Bakterien mit Hilfe eines sterilen Trigalsky Spatels. Die Animpfung der Flüssigkultur erfolgte durch Picken eines Klons mit einer sterilen Pipette. Inkubiert wurden die Kulturen bei 37 °C im Brutschrank oder im Falle der Flüssigkulturen im Schüttler bei 250 U/min und 24 °C.

1.1.2 TRANSFORMATION IN *E. COLI*

Für die Transformation von Plasmid DNA in Bakterien wurden kompetente *E. coli* Kulturen 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 1 pg bis 100 ng der Plasmid DNA zugegeben und vorsichtig kurz geschwenkt um die Zellen mit dem Plasmid zu vermischen. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis bevor ein 30 Sekunden andauernder Hitzeschock bei 42 °C appliziert wurde. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 5 Minuten wurde 1 ml LB Medium (V7.1) zugegeben und die Zellen bei 37 °C für 60 Minuten und Rotation (250 U/min) inkubiert. 100 µl wurden auf eine LB-Selektionsplatte mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert und die Platte wurde für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

1.1.3 ISOLIERUNG VON PLASMID DNA (MINI- UND MIDI-PRÄPARATION)

Für eine DNA Mini-Präparation wurde eine 5 ml bzw. für eine DNA Midi-Präparation eine 50 ml *E. coli* LB-Flüssigkultur mit Selektionsantibiotika (V7.1) am Vortag der Präparation angeimpft. Die Midi-Präparation wurde mit den NucleoBond® Xtra Midi Kits von Macherey-Nagel nach den Herstellerangaben durchgeführt, die Plasmide mit 500 µl TE-Puffer eluiert und die Plasmidkonzentration anschließend photometrisch bestimmt. Für die Mini-Präparation wurden aus der 5 ml Flüssigkultur 1,2 ml entnommen und in einem 1,5 ml Reagiergefäß bei 4000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 µl Solution 1 (V7.3) resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden zur Zelllyse 200 µl Solution 2 (V7.3) zugegeben und durch vorsichtiges Schwenken gemischt. Es folgte zur Neutralisation der

Probe eine Zugabe von 150 µl Solution 3 (V7.3) und eine weitere Inkubation auf Eis für 5 Minuten. Die nicht löslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13.000 U/min für 5 Minuten bei 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reagiergefäß gegeben und die Plasmide durch Zugabe von 900 µl 100 % Ethanol für 10 Minuten auf Eis gefällt. Durch Zentrifugation (13.000 U/min, 10 Minuten, 4 °C) wurden die Plasmide pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Durch Zugabe von 10 µl einer 4 %igen RNase-Lösung und Inkubation für 20 Minuten bei 37 °C wurden unerwünschte RNAs entfernt und das Pellet gelöst. Der Reinheitsgrad der mit dieser Methode erhaltenen Plasmid-DNA ist ausreichend für eine Transformation in *E. coli* (1.1.2) oder Transfektion in humane Zellen (1.2.4.1). Wurde die Plasmid DNA für eine anschließende Sequenzierung isoliert, musste eine weitere Aufarbeitung der Plasmide erfolgen. Hierfür wurden 30 µl einer Ethanol/Natriumacetat-Lösung (V7.3) zugegeben und die DNA 30 Minuten auf Eis gefällt. Die Plasmide wurden mit Hilfe der Zentrifuge (13.000 U/min, 15 Minute, 4 °C) pelletiert und anschließend mit 20 µl einer 70 %igen Ethanol Lösung gewaschen. Nach einem erneuten Pelletieren der Plasmide (13.000 U/min, 15 Minuten, 4 °C) wurde das Pellet getrocknet und in 20 µl H₂O gelöst. Die Langzeitlagerung der isolierten Plasmide aus Mini- und Midi-Präparation erfolgte bei -20 °C.

1.2 ZELLKULTURMETHODEN

Alle Zellkulturtätigkeiten wurden bei Raumtemperatur (24 °C) und unter sterilen Bedingungen, d.h. mit sterilen Arbeitsmaterialien, Handschuhen, Laborkittel und ausschließlich unter der Sterilbank, durchgeführt.

1.2.1 AUFTAUEN VON TIEFGEFRORENEN ZELLINIEN

Die für diese Arbeit verwendeten Zelllinien wurden Langzeit gelagert entweder bei -80 °C im Tiefgefrierschrank oder bei ca -196 °C in der flüssigen Phase eines Stickstofftanks. Um die gefrorenen Zellen zu kultivieren wurden sie bei 37 °C im Wasserbad zügig aufgetaut, mit 50 ml Kultivierungsmedium gewaschen und anschließend in eine T25 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch neues vorgewärmtes Medium ausgetauscht. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 500 µl einer Trypsin/EDTA-Lösung vom Flaschenboden vollständig gelöst und in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Nach dem Pelletieren der Zellen durch eine 4 minütige Zentrifugation bei 1.200 U/min (300 g) wurden sie in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und in eine T75 cm² Zellkulturflasche überführt.

1.2.2 KULTIVIERUNG VON HUMANEN ZELLEN

Alle humanen Zellkulturzellen wurden in ihren entsprechenden Kultivierungsmedien bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Es wurden zwei verschiedene Kultivierungsmedien verwendet, zum einen DMEM mit 10 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin für alle Zelllinien mit Ausnahme von Mel Juso, Mel Ju und Mel Ho, die zur Kultivierung RPMI Medium mit 10 % (v/v) FKS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin benötigen. Passagiert wurden die adhärenenten Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS durch Zugabe einer Trypsin/EDTA Lösung. Nachdem sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde Kultivierungsmedium mit FKS zugegeben um die Zellen aufzunehmen. Um das Trypsin zu entfernen wurde 4 Minuten bei 1.200 U/rpm (300 g) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Zellkulturmedium mit FKS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellen 1:5 bis 1:10 mit Medium verdünnt und in neuen Zellkulturflaschen ausgesät. Das Zellkulturmedium wurde jeden dritten Tag erneuert.

1.2.3 EINFRIEREN VON ZELLINIEN

Um Zellen Langzeit zu Lagern wurde zunächst das tiefgefrorene Einfriermedium im Kühlschrank aufgetaut. Die Cryo-Röhrchen wurden beschriftet und in einem Kühlblock vorgekühlt, bevor sie mit 900 µl Einfriermedium gefüllt wurden. Die Zellen einer vollen T75 Zellkulturflasche wurden einmal mit PBS gespült und anschließend durch eine Trypsin/EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst. Es folgte eine Zugabe von 10 ml des entsprechenden Zellkulturmediums mit FKS und eine 4 minütige Zentrifugation bei 1.200 U/min (300g). Das Pellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium mit FKS aufgenommen und vollständig resuspendiert. 900 µl der Zellsuspension wurden jeweils in die mit Einfriermedium vorgekühlten Cryo-Röhrchen pipettiert, kurz geschüttelt um beide Medien zu vermischen und eine Stunde bei -20 °C eingefroren. Für eine Lagerung über mehrere Monate wurden die Cryo-Röhrchen anschließend auf -80 °C überführt oder für eine Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

1.2.4 TRANSFEKTION HUMANER ZELLEN

1.2.4.1 TRANSFEKTION MIT PLASMIDEN

Die transiente Transfektion von Plasmiden in Säugetierzellen wurde mittels Lipofectamin LTX & Plus Transfectionsreagenz von life technologie™ (Darmstadt) durchgeführt. Dabei wurden, falls nicht anders vermerkt, 120.000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte in 2 ml des entsprechenden Zellkulturmediums ausgesät. Nachdem die Zellen adhärent waren, jedoch frühestens 4 Stunden

nach Aussaat, wurde zum Medium das Transfektionsreagenz zugegeben. Die Herstellung des Transfektionsreagenzes erfolgte nach den Herstellerangaben.

1.2.4.2 TRANSFEKTION MIT KLEINEN RNA-MOLEKÜLEN (siRNAs UND shRNAs)

Die Transfektion humaner Zelllinien mit kleinen RNA Molekülen (siRNAs und shRNA Moleküle) erfolgte unter Verwendung des Lipofectamine® RNAiMAX Transfektionsreagenz von life technologies™ (Darmstadt). Hierfür wurden 120.000 Zellen pro Well einer 6-Well Kulturplatte in 2,5 ml DMEM- oder RPMI-Medium ohne FKS ausgesät. Anschließend wurden pro Well 30 pmol der entsprechenden siRNA (20µM Stock-Lösung) in 250 µl DMEM oder RPMI ohne FKS gelöst. 5 µl des RNAiMAX Transfektionsreagenzes wurden mit 245 µl DMEM oder RPMI ohne FKS ebenfalls gemischt und anschließend zur siRNA-Lösung zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, 10 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend unter Schwenken zu den Zellen pipettiert. Sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen nach 24 oder 48 Stunden geerntet und in Abhängigkeit vom Ziel des jeweiligen Versuches weiterverarbeitet. Alternativ konnte zu diesem Zeitpunkt ein Wechsel des Mediums unter erneuter Zugabe von Transfektionsreagenzien (Doppeltransfektion) durchgeführt werden.

1.2.5 MIGRATIONS ASSAY (BOYDEN-KAMMER)

Boyden-Kammern wurden im unteren Kompartiment mit 210 µl konditioniertem Medium gefüllt. Für die Herstellung des konditionierten Mediums wurden konfluente Fibroblasten 24 Stunden in Medium ohne FKS kultiviert. Anschließend wurden die Fibroblasten abzentrifugiert und der Mediumüberstand in den Migrations-Assay eingesetzt. Über das konditionierte Medium wurde ein Polykarbonat Filter (Neuro Probe, Gaithersburg, USA) mit einer Porengröße von 8 µm luftblasenfrei aufgelegt und der Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Für den Migrations Assay erfolgte im Vorfeld eine Beschichtung des Filters mit Gelatine (siehe 1.2.6). Die zu analysierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch Trypsin/EDTA gelöst, in Zellkulturmedium ohne FKS aufgenommen und auf eine Zellzahl von 30.000 Zellen pro ml eingestellt. Anschließend wurden 800 µl der Zellsuspension in das obere Kompartiment der Boydenkammer eingebracht und vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es folgte die Färbung der migrierten Zellen, wobei zuerst der Filter aus der Boydenkammer genommen wurde. Die Oberseite des Filters wurde an einem feuchten Papiertuch abgewischt um nicht migrierte Zellen zu entfernen. Nach Einspannen der Filter in einen Färberahmen wurden die Zellen mittels Hemacolor Schnellfärbung (bestehend aus Fixierlösung, Eosin-Färbelösung und

Thiazin-Färbelösung; Merck, Darmstadt) gefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der gewanderten Zellen durch Auszählen im Mikroskop bestimmt.

1.2.6 HERSTELLUNG VON GELATINE FILTERN

Die für den Migrations Assays benötigten Polykarbonat Filter mit einer Porengröße von 8 µm mussten vor dem Versuch mit Gelatine beschichtet werden. Dies war nötig, um eine verbesserte Adhäsion der Zellen zu erreichen. Die Filter wurden hierzu für 20 Minuten in 0,5% (v/v) Essigsäure bei 50°C gewaschen. Anschließend wurde in einem Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Filter eine Stunde in einer Gelatine-Lösung (5mg/l) gekocht, erneut abfiltriert, einzeln auf Papier ausgelegt und eine Stunde bei 100°C getrocknet.

2 NUKLEINSÄURE ARBEITEN

2.1 RNA-ISOLIERUNG AUS HUMANEN ZELLEN

Die RNA Isolierung aus humanen Zellen wurde mit einem Rneasy® Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80% oder nach Erreichen der Behandlungsdauer mit PBS gespült und anschließend mit einer Trypsin/EDTA Lösung von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst. Anschließend wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 3.000 U/min für 3 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde in 350 µl RNA Lysepuffer resuspendiert bzw. lysiert und wurde nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Zur Isolierung von RNA aus Gewebe wurden Gewebestücke (ca. 0,05 g) in jeweils 700 µl Lysepuffer mit einem Stab-Homogenisator (Xenox, Niersbach) aufgeschlossen und über eine QIASHredder-Säule (Qiagen) aufgereinigt. Aus dem Eluat wurde die RNA analog zur RNA Isolierung aus kultivierten Zellen aufgereinigt. Die mit ddH₂O eluierte RNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2 REVERSE TRANSKRIPTION VON RNA IN CDNA

Für die reverse Transkription wurden 500 µg RNA als Ausgangsmaterial der Reaktion eingestzt. Zugegeben wurden 4 µl First Strand Buffer (5x), 2µl DTT (0,1M), 1µl dNTP (10mM), 1µl dN6 Random Primer und auf ein Volumen von 10 µl mit H₂O eingestellt. Zunächst wurde für 5 Minuten auf 70°C erhitzt und nach Abkühlung auf ca. 50°C wurden 1 µl Superscript II dazugegeben und der Reaktionsmix bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Zur Inaktivierung der Superscript II wurde für

Probe für 10 Minuten auf 70°C erhitzt. Die RNA wurde durch einen 30 minütigen Restriktion mit RnaseA bei 37°C entfernt.

2.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA- UND RNA-LÖSUNGEN

Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung wurde durch eine photometrische Messung der UV Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für optische Dichten < 1 gilt dabei näherungsweise folgender linearer Zusammenhang:

1 OD_{260nm} Einheit = 50 µg/ml ds DNA (doppelsträngige DNA) oder 40 µg/ml RNA

Die Messung erfolgte an einem NanoDrop® ND-1000 UV/VISspektralphotometer (Peglab, Erlangen).

2.4 POLYMERASE KETTENREAKTION

Bei Amplifikationen für Klonierungen oder Mutagenesen wurde stets die Phusion High Fidelity Polymerase verwendet, da sie über eine Korrekturlesefunktion (proof-reading) verfügt. Ein Reaktionsansatz bestand aus den in Tabelle 1 aufgezeigten Reaktionskomponenten.

Tabelle 1 PCR Reaktionsansatz

Menge	Reaktionskomponente
5 µl	10x PCR-Puffer
0,5 µl	dNTP Mix (jedes Nukleotid 10 mM)
1,0 µl	Primer forward (20 mM)
1,0 µl	Primer reverse (20 mM)
<250 ng	Template-DNA
0,5 µl	Phusion Polymerase (2 U/µl)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Die PCR wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Nach einer initialen Denaturierung bei 98°C für 30 s wurde der folgende Zyklus 32 Mal durchlaufen. Die Denaturierung der DNA wurde ebenfalls bei 98°C für 30 s durchgeführt. Es folgte das Annealen der Primer bei einer primerspezifischen Annealingtemperatur für 20 s. Die Annealingtemperatur wurde so gewählt, dass sie 3°C über der Schmelztemperatur des Primers mit der kleineren T_m Temperatur lag. Die Elongation, bei der die DNA Synthese erfolgt, wurde bei 72°C durchgeführt. Die Elongationszeit ist dabei abhängig von der Länge der zu synthetisierenden DNA und der Synthesegeschwindigkeit

der Polymerase (Phusion Polymerase benötigt 15 s bis 30 s pro 1kb). Mit einer finalen Elongation von 5 Minute bei 72°C endet die PCR, wobei die Proben im Anschluss noch auf 4°C gekühlt werden.

Tabelle 2 Programm der PCR

Stufe	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98°C	30 s
Denaturierung	98°C	5-10 s
Annealing	45-72°C	10-30 s
Elongation	72°C	15-30 s/1kb
Finale Elongation	72°C	5-10 min
Lagerung	4-10°C	

2.5 QUANTITATIVE REAL-TIME PCR (qRT-PCR)

Um die Expressionsstärke eines spezifischen Gens zu messen und zu quantifizieren wurde eine quantitative Real Time-PCR unter Verwendung des LightCycler® II Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) angewendet.

Die qRT-PCR Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz nach Anleitung des Herstellers durchgeführt:

- 8,0 µl ddH₂O
- 0,5 µl Primer forward (20 µM)
- 0,5 µl Primer reverse (20 µM)
- 10 µl TaKaRa SYBR® Premix Ex Taq™
- 1,0 µl cDNA Template (10 ng/µl)

Der Versuchsansatz wurde dabei im LightCycler II folgendem Programm unterzogen:

- Initiale Denaturierung (1 Zyklus): 20°C/s auf 95°C, 30 sek
- 40 Zyklen:
 - Denaturierung: 20°C/s auf 95°C, 10 sek
 - Annealing: 20°C/s auf 55-65°C, 10 sek
 - Elongation 20°C/s auf 72°C, 20 sek

Die Anzahl der Zyklen und die erforderliche optimale Annealingtemperatur wurden jeweils experimentell für jedes Primer-Paar spezifisch ermittelt. Eine Schmelzpunktanalyse sowie die Analyse der entstandenen Produkte auf 2%igen Agarosegelen stellten die Spezifität der Reaktion

sicher. Die Quantifizierung der mRNA Expression erfolgte mit der zugehörigen LightCycler II Software nach Angaben des Herstellers, wobei zur Standardisierung β -Aktin als Referenzgen genutzt wurde.

2.6 RESTRIKTION VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN

Die Restriktion von DNA durch Restriktionsendonukleasen erfolgte in einem 10 μ l Reaktionsansatz bestehend aus 500 ng Plasmid-DNA , 5 Units Enzym (NEB, Ipswich, USA) und 1 μ l des vom Hersteller empfohlenen 10x Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei optimaler Reaktionstemperatur der jeweiligen Restriktionsendonuklease inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.7 GERICHTETE MUTAGENESE

Die Mutagenesen wurden nach dem Protokoll des Phusion Site-Directed Mutagenese Kits (Thermo Scientific) durchgeführt. Dabei wurde zuerst mit 5'phosphorylierten Primern, die die Mutationssequenz beinhalten eine PCR (2.4) durchgeführt, bei der das zu mutierende Plasmid vollständig amplifiziert wurde. Anschließend erfolgte die Ligation des linear vorliegenden PCR-Produkts durch eine T4 DNA Ligase. Durch eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym DpnI (2.6) wurde die nicht mutierte methylierte Template-DNA geschnitten bevor das Ligationsprodukt in *E.coli* transformiert (1.1.2) wurde.

3 PROTEIN ARBEITEN

3.1 HERSTELLUNG VON GESAMTPROTEINEXTRAKTEN

Zur Extraktion der Proteine aus humanen Zellen wurden die konfluent wachsenden Zellen einmal mit PBS gewaschen und durch eine Trypsin/EDTA Lösung vom Flaschenboden gelöst und in 1 ml Zellkulturmedium mit FKS aufgenommen. Nach dem Pelettiertn durch eine Zentrifugation der Zellen bei 3.000 U/min für 5 Minuten wurde das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen bevor es in 200 μ l RIPA Puffer resuspendiert und 15 Minuten bei 4°C und 850 U/min geschüttelt wurde. Durch einen zweiten Zentrifugationsschritt (4°C, 10 min, 13.000 Upm (15.000 g)) konnten die im Lysepuffer gelösten Proteine von den nicht löslichen Zellbestandteilen (DNA, Zelldebris) getrennt werden. Das Proteinextrakt wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.2 ISOLIERUNG VON PROTEINEN AUS ZELLKERN UND ZYTOPLASMA (KERN-PRÄPARATION)

Um Proteindegradationen während der Isolierung nach Möglichkeit zu vermeiden, wurden alle Schritte bei 4°C auf Eis ausgeführt. Zuerst wurde das Zellkulturmedium von den Zellen entfernt und diese einmal mit PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml PBS zugegeben und die Zellen mit dem Zellschaber vom Flaschenboden mechanisch gelöst und in ein Reagiergefäß überführt um die Zellen bei einer 5 minütigen Zentrifugation bei 3.000 U/min zu pelletieren. Das Pellet wurde in 400 µl Puffer 1 resuspendiert und 15 min inkubiert, bevor 25 µl 10 % NP-40 zugegeben wurden. Nach einer Zentrifugation bei 10.000 U/min für eine Minute trennte sich die obere zytoplasmatische Fraktion von der unteren Kernfraktion. Der Überstand mit den Proteinen des Zellzytoplasmas wurde separiert, der Proteingehalt mittels BCA (3.3) bestimmt und bei -80°C gelagert. Das Kernpellet wurde mit 50 µl Puffer 2 (V7.7) resuspendiert und unter Schütteln (250 U/min) 15 Minuten inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 13.000 U/min für 10 Minuten trennte sich der Überstand mit den Kernproteinen von den nicht löslichen Bestandteilen. Ein Teil der Kernfraktion wurde für einen BCA-Test separiert, der Rest in ein neues Reagiergefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON GESAMT- UND KERNPROTEINEXTRAKTEN

Es wurde das BCA Protein Assay Kit von Pierce/Peribo Science, Bonn verwendet. Zu je 5 µl Proteinlösung bzw. Mischung aus 1 µl Kernextrakt und 4 µl ddH₂O wurden 200 µl alkalische BCA-Kupfer(II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in das Well einer 96-Well Platte gegeben. Die Platte wurde 5-20 Minuten bis zur Entwicklung der violetten Färbung bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Messung der Absorbtion erfolgte bei 562 nm in einem ELISA-Reader (MWG Biotech, Ebersberg). Durch die parallele Quantifizierung eines mitgeführten BSA (bovinen Serum Albumin)-Standards über drei Zehnerpotenzen konnte aus der jeweiligen Absorbtion die Konzentration der Proteine berechnet werden. Für jedes Proteinextrakt erfolgte die Bestimmung der Konzentration in Doppelbestimmung.

3.4 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden pro Gelspur 40 µg Gesamtproteinextrakt in 4x Roti-Load1 Auftragspuffer für 5 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² Gelfläche auf 8 bis 12%igen Polyacrylamid (PAA) Gelen aufgetrennt. Zum Abgleich des Molekulargewichtes wurde der Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™ mit

aufgetragen. Die PAA-Prozentigkeit des Gels richtet sich nach der Größe des zu untersuchenden Proteins und ist in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. Zuordnung der Polyacrylamidprozentigkeit des SDS-Pages zur Proteingröße

Polyacrylamid (%)	Größe des Proteins (kDa)
15	10-43
12	12-60
10	20-80
7,5	36-94
5	57-212

3.5 SDS-PAGE COOMASSIE FÄRBUNG

Das Gel wurde für 5 bis 20 Minuten in die Coomassie-Färbelösung eingelegt und leicht geschwenkt. Anschließend erfolgte die Entfärbung des Gels durch eine Entfärbelösung bis die gewünschte Bandenintensität erreicht war.

3.6 SDS-PAGE SILBERFÄRBUNG

Durchgeführt wurde die Silberfärbung mit dem SilverQuest™ Silver Staining Kit von life technologies™ nach den Herstellerangaben. Da die Silberfärbung deutlich sensitiver ist als die Coomassie Färbung wurde sie immer dann verwendet, wenn die zu erwartenden Proteinbanden sehr schwach ausgeprägt waren. Das verwendete Kit ist zudem geeignet die erhaltenen Proteinbanden durch eine massenspektrometrische Untersuchung zu analysieren.

3.7 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN (IHC)

Für die immunhistochemischen AGO2 Färbungen wurden zur Detektion des AGO2 Antikörpers Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Sekundärantikörper verwendet, somit handelt es sich hierbei um eine Immunfluoreszenzmethode.

Es wurden 80.000 Zellen in eine 4 chamber cover slide in entsprechendes Nährmedium ausgesät und 24 Stunden inkubiert bis alle Zellen adhärent waren. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch vorgekühltes Aceton bei -20°C für 15 Minuten auf dem cover slide fixiert. Nach einmaligem Waschen der fixierten Zellen mit PBS wurden sie mit einer Blockierungslösung für 1 Stunde inkubiert. Nachdem Entfernen der Blockierungslösung wurde der AGO2

Primärantikörper (11A9, (Rudel *et al.* 2008)) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch dreimaliges Spülen mit PBS wurde nichtgebundener Primärantikörper entfernt, bevor ein Fluoresceinisothiocyanat Isomer I (FITC) gekoppelter Sekundärantikörper zugegeben und für eine Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Dreimal wurde im Anschluss mit PBS gewaschen und eine DAPI-Lösung zur Kernfärbung zugegeben bevor die Zellen mit einem Deckglas möglichst luftblasenfrei abgedeckt wurden. Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop und anschließender Quantifizierung durch das Programm Image J.

3.8 WESTERN BLOT

Der Western Blot oder Immuno Blot ist eine Methode zur Proteinanalyse, die 1979 von W.N. Burnette entwickelt wurde (Burnette 1981). Zu Beginn wurden die fertigen SDS-Gele für 15 min in Blotpuffer (V7.8) äquilibriert. Zeitgleich wurde die PVDF Membran zur Aktivierung erst in Methanol für 5 min und anschließend 5 min in Blotpuffer inkubiert. Alle Western Blot Analysen wurden im „semidry“ Western Blot Verfahren mit einem Bio-Rad, Wide Mini Sub®Cell GT Blotter durchgeführt, dafür wurden die PVDF Membran mit dem SDS Gel zwischen zwei feuchte Filterpapiere gespannt und 48 min bei 15 V und 400 mA geblottet. Die Spannungstärke und die Dauer sind abhängig von der Proteingröße des zu untersuchenden Proteins (die hier angegebenen Werte beziehen sich auf AGO2 mit einer Größe von 97 kDa). Zur Reduktion unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver/TBS-Tween (0,1 %) abgesättigt und über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei RT mit dem spezifischen Primär-Antikörper in spezifischer Verdünnung in 5 % BSA/TBST geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran für eine Stunde mit dem Sekundär-Antikörper in 5 % Milchpulver/TBS-Tween (0,1 %) inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-Tween (0,1%) Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des ECL Plus Western Blotting Detection Kits (GE-Healthcare, England).

3.9 IMMUNOPRÄZIPITATION

Zunächst wurden 30 µl Protein-G-Sepharose-Beads (GE Healthcare, München, Deutschland) dreimal mit PBS gewaschen bevor sie über Nacht bei 4°C unter Rotieren mit dem Antikörper gekoppelt wurden. Die zu analysierenden Zellen (ca. 3×10^6) wurden mit 200 µl IP-Lyse-Puffer (V7.4) 20 Minuten auf Eis lysiert und nicht lösliche Bestandteile anschließend bei 4°C für 20 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Die für eine IP benötigte Proteinmenge sollte mindestens 100 µg betragen und wurde mit IP-Waschpuffer (V7.4) auf ein Volumen von 300 µl eingestellt. Die

an den Antikörper gekoppelten Beads wurden drei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Das Zelllysats wurde nun zu den an die Beads gebundenen Antikörpern gegeben und für 3 Stunden bei 4°C unter Rotation inkubiert. Abschließend wurden die Beads vier Mal mit eiskaltem IP-Waschpuffer gewaschen bevor die präzipitierten Proteine durch Zugabe von 4x RotiLoad1 und einer Inkubation bei 70°C für 5 Minuten eluiert wurden. Analysiert wurde die IP über eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.4) gefolgt von einem Western Blot oder einer Silberfärbung.

3.10 AGO-APP (AGO-AFFINITY PURIFICATION BY PEPTIDES)

Die AGO-APP Methode wurde verwendet um Mengenverhältnisse zwischen den vier humanen Argonaut Proteinen in einer Probe zu ermitteln. Da es sich bei der AGO-APP um eine noch nicht publizierte Methode handelt, wird an dieser Stelle nur das generelle Funktionsprinzip vorgestellt. Die Methode beruht darauf, dass durch einen Protein pull-down mittels eines GST getaggen Peptides, welches gleiche Bindungs-Affinität zu jedem der vier verschiedenen humanen Argonaut Proteinen aufweist, die Argonaute Proteine aus einer Probe konzentriert werden und anschließend durch die Massenspektrometrie quantifiziert werden können. Das verwendete Peptid enthält zusätzlich zum GST Tag noch eine Aminosäuresequenz, die von einer PreScission Protease spezifisch erkannt und geschnitten wird. Nachdem die Glutathion Sepharose 4 Fast Flow Beads zweimal mit PBS gewaschen wurden, erfolgte eine Kopplung mit dem Peptid bei 4°C für 3 Stunden unter Rotation. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von NET-puffer und einer Inkubation von 20 Minuten bei 4°C und anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 15.000 g. Die Beads mit dem gekoppelten Peptid wurde mit PBS gewaschen um ungebundenes Peptid zu entfernen. Es folgte die Zugabe des Zelllysats zu den Beads und eine 3 stündige Inkubation bei 4°C unter Rotation. Anschließend wurde dreimal mit 1 ml NET Puffer gewaschen (1 min; 1.000 g; 4°C). Nach der letzten Zentrifugation wurde 40 µl Lyse Puffer auf die Beads gegeben und bei 4°C über Nacht unter Rotation eluiert. Das Eluat wurde über eine SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden über eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Argonaut Bande bei einer Größe von 97 kDa wurde mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und bis zur massenspektrometrischen Untersuchung bei -20°C in einem Reagiergefäß tiefgefroren. Die massenspektrometrische Analyse wurde von Dr. Astrid Bruckmann (AG Meister, Universität Regensburg) durchgeführt.

3.11 MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die massenspektrometrischen Untersuchungen der Argonaut Proteine wurden von PD. Dr. Jörg Reinders in der Funktionellen Genomik Regensburg durchgeführt.

Die nach einer AGO2 Immunopräzipitation (3.9) aus Mel Ju Zellen nachweisbaren AGO2 Banden in einer SDS-PAGE wurden durch eine Silberfärbung (3.6) gefärbt und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelbanden wurden nacheinander jeweils zweimal mit 50 µl 50 mM NH_4HCO_3 (Lösung 1) und anschließend mit 50 µl 25 mM NH_4HCO_3 in 50% Acetonitril (Lösung 2) gewaschen. Um Disulfidbindungen innerhalb der Proteine zu lösen wurden die Gele für 30 Minuten bei 56°C in 10 mM DTT in Lösung 1 inkubiert. Durch eine weitere 30 minütige Inkubation in 5 mM Iodacetamid in Lösung 1 wurden die Cysteine mit freien SH-Gruppen in das stabile S-Carboxyamidomethylcystein überführt. Es folgte eine zweimalige Spülung der Proben mit Lösung 1 und 2 und anschließender Trocknung in einer Vakuum Zentrifuge. Rehydriert wurden die getrockneten Gelstücke durch Zugabe von 6 µl einer Trypsin Lösung die die Proteine bei 37°C über Nacht im Gel verdaute. Eluiert wurden die entstandenen Peptide mit 20 µl einer 5%igen Ameisensäure. Die Analyse erfolgte durch eine Flüssigchromatographie mit einer Massenspektrometrie Kopplung (nano-LC-MS/MS). Die gewonnenen Massenspektren wurden durch das Programm Mascot Distiller (Version 2.4.2.0) mit der Uniprot-Datenbank durch den Mascot Algorithmus (Version 2.2; Matrix Science LTD., London, UK) abgeglichen.

Die für eine Peptididentifikation verwendeten Parameter waren

1. Trypsin als Protease
2. maximal eine nicht geschnittene Trypsin Schnittstelle
3. S-Carboxyamidomethylcystein als Proteinmodifikation
4. die Oxidation von Methionin
5. nur doppelt und dreifach geladene Ionen wurden zugelassen.

Zu einer positiven Proteinidentifizierung wurden nur Proteine zugelassen von denen mindestens zwei unabhängige Peptide des Proteins mit zugehörigen signifikanten Massenspektren identifiziert wurden.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Albelda S. M., Mette S. A., Elder D. E., Stewart R., Damjanovich L., Herlyn M. and Buck C. A.** (1990). "Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression." *Cancer Res* 50: 6757-6764.
- Armstrong B. K. and Krickler A.** (2001). "The epidemiology of UV induced skin cancer." *J Photochem Photobiol B* 63: 8-18.
- Bader A. G., Brown D. and Winkler M.** (2010). "The promise of microRNA replacement therapy." *Cancer Res* 70: 7027-7030.
- Balch C. M., Gershenwald J. E., Soong S. J., Thompson J. F., Atkins M. B., Byrd D. R., Buzaid A. C., Cochran A. J., Coit D. G., Ding S., Eggermont A. M., Flaherty K. T., Gimotty P. A., Kirkwood J. M., McMasters K. M., Mihm M. C., Jr., Morton D. L., Ross M. I., Sober A. J. and Sondak V. K.** (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." *J Clin Oncol* 27: 6199-6206.
- Bartel D. P.** (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions." *Cell* 136: 215-233.
- Bashkurov V. I., Scherthan H., Solinger J. A., Buerstedde J. M. and Heyer W. D.** (1997). "A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates." *J Cell Biol* 136: 761-773.
- Behrens C. L., Thorgaard C., Philip A. and Bentzen J.** (2013). "Sunburn in children and adolescents: associations with parents' behaviour and attitudes." *Scand J Public Health* 41: 302-310.
- Bell R. E. and Levy C.** (2011). "The three M's: melanoma, microphthalmia-associated transcription factor and microRNA." *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 1088-1106.
- Bemis L. T., Chen R., Amato C. M., Classen E. H., Robinson S. E., Coffey D. G., Erickson P. F., Shellman Y. G. and Robinson W. A.** (2008). "MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines." *Cancer Res* 68: 1362-1368.
- Bennett P. E., Bemis L., Norris D. A. and Shellman Y. G.** (2013). "miR in melanoma development: miRNAs and acquired hallmarks of cancer in melanoma." *Physiol Genomics* 45: 1049-1059.
- Berlin I., Denat L., Steunou A. L., Puig I., Champeval D., Colombo S., Roberts K., Bonvin E., Bourgeois Y., Davidson I., Delmas V., Nieto L., Goding C. R. and Larue L.** (2012). "Phosphorylation of BRN2 modulates its interaction with the Pax3 promoter to control melanocyte migration and proliferation." *Mol Cell Biol* 32: 1237-1247.
- Bertolotto C.** (2013). "Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options." *Scientifica (Cairo)* 2013: 635203.
- Besaratinia A. and Tommasi S.** (2014). "Epigenetics of human melanoma: promises and challenges." *J Mol Cell Biol.*
- Bitko V., Musiyenko A., Shulyayeva O. and Barik S.** (2005). "Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA." *Nat Med* 11: 50-55.
- Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M. and Benning C.** (1998). "AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development." *EMBO J* 17: 170-180.
- Boyle G. M., Woods S. L., Bonazzi V. F., Stark M. S., Hacker E., Aoude L. G., Dutton-Regester K., Cook A. L., Sturm R. A. and Hayward N. K.** (2011). "Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor." *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 525-537.
- Braig S., Mueller D. W., Rothhammer T. and Bosserhoff A. K.** (2010). "MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma." *Cell Mol Life Sci* 67: 3535-3548.
- Breslow A.** (1970). "Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma." *Ann Surg* 172: 902-908.

- Burnette W. N.** (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* 112: 195-203.
- Calin G. A. and Croce C. M.** (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." *Nat Rev Cancer* 6: 857-866.
- Cantile M., Scognamiglio G., Anniciello A., Farina M., Gentilcore G., Santonastaso C., Fulciniti F., Cillo C., Franco R., Ascierto P. A. and Botti G.** (2012). "Increased HOX C13 expression in metastatic melanoma progression." *J Transl Med* 10: 91.
- Caramuta S., Egyhazi S., Rodolfo M., Witten D., Hansson J., Larsson C. and Lui W. O.** (2010). "MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma." *J Invest Dermatol* 130: 2062-2070.
- Carracedo A. and Pandolfi P. P.** (2008). "The PTEN-PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks." *Oncogene* 27: 5527-5541.
- Carthew R. W. and Sontheimer E. J.** (2009). "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs." *Cell* 136: 642-655.
- Carvajal R. D.** (2013). "Another option in our KIT of effective therapies for advanced melanoma." *J Clin Oncol* 31: 3173-3175.
- Chapman P. B., Hauschild A., Robert C., Haanen J. B., Ascierto P., Larkin J., Dummer R., Garbe C., Testori A., Maio M., Hogg D., Lorigan P., Lebbe C., Jouary T., Schadendorf D., Ribas A., O'Day S. J., Sosman J. A., Kirkwood J. M., Eggermont A. M., Dreno B., Nolop K., Li J., Nelson B., Hou J., Lee R. J., Flaherty K. T. and McArthur G. A.** (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." *N Engl J Med* 364: 2507-2516.
- Chekulaeva M., Mathys H., Zipprich J. T., Attig J., Colic M., Parker R. and Filipowicz W.** (2011). "miRNA repression involves GW182-mediated recruitment of CCR4-NOT through conserved W-containing motifs." *Nat Struct Mol Biol* 18: 1218-1226.
- Cheloufi S., Dos Santos C. O., Chong M. M. and Hannon G. J.** (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." *Nature* 465: 584-589.
- Chen D., Xu W., Bales E., Colmenares C., Conacci-Sorrell M., Ishii S., Stavnezer E., Campisi J., Fisher D. E., Ben-Ze'ev A. and Medrano E. E.** (2003). "SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma." *Cancer Res* 63: 6626-6634.
- Chen J., Feilottter H. E., Pare G. C., Zhang X., Pemberton J. G., Garady C., Lai D., Yang X. and Tron V. A.** (2010). "MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma." *Am J Pathol* 176: 2520-2529.
- Chen Y. L., Yuan R. H., Yang W. C., Hsu H. C. and Jeng Y. M.** (2013). "The stem cell E3-ligase Lin-41 promotes liver cancer progression through inhibition of microRNA-mediated gene silencing." *J Pathol* 229: 486-496.
- Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K. and Shiekhattar R.** (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." *Nature* 436: 740-744.
- Cichorek M., Wachulska M., Stasiewicz A. and Tyminska A.** (2013). "Skin melanocytes: biology and development." *Postepy Dermatol Alergol* 30: 30-41.
- Clark W. H.** (1991). "Tumour progression and the nature of cancer." *Br J Cancer* 64: 631-644.
- Clark W. H., Jr., Elder D. E., Guerry D. t., Epstein M. N., Greene M. H. and Van Horn M.** (1984). "A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma." *Hum Pathol* 15: 1147-1165.
- Clark W. H., Jr., From L., Bernardino E. A. and Mihm M. C.** (1969). "The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin." *Cancer Res* 29: 705-727.
- Costa F. F., Seftor E. A., Bischof J. M., Kirschmann D. A., Strizzi L., Arndt K., Bonaldo Mde F., Soares M. B. and Hendrix M. J.** (2009). "Epigenetically reprogramming metastatic tumor cells with an embryonic microenvironment." *Epigenomics* 1: 387-398.

- Dankort D., Curley D. P., Cartlidge R. A., Nelson B., Karnezis A. N., Damsky W. E., Jr., You M. J., DePinho R. A., McMahon M. and Bosenberg M.** (2009). "Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma." *Nat Genet* 41: 544-552.
- Dar A. A., Majid S., de Semir D., Nosrati M., Bezrookove V. and Kashani-Sabet M.** (2011). "miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein." *J Biol Chem* 286: 16606-16614.
- Das S. K., M A. and Subudhi M.** (2013). "Giant congenital melanocytic nevi: a case report." *J Clin Diagn Res* 7: 154-155.
- Das S. K., Sokhi U. K., Bhutia S. K., Azab B., Su Z. Z., Sarkar D. and Fisher P. B.** (2010). "Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 11948-11953.
- Das Thakur M., Salangsang F., Landman A. S., Sellers W. R., Pryer N. K., Levesque M. P., Dummer R., McMahon M. and Stuart D. D.** (2013). "Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance." *Nature* 494: 251-255.
- de Braud F., Khayat D., Kroon B. B., Valdagni R., Bruzzi P. and Cascinelli N.** (2003). "Malignant melanoma." *Crit Rev Oncol Hematol* 47: 35-63.
- Deng Y., Deng H., Bi F., Liu J., Bemis L. T., Norris D., Wang X. J. and Zhang Q.** (2011). "MicroRNA-137 targets carboxyl-terminal binding protein 1 in melanoma cell lines." *Int J Biol Sci* 7: 133-137.
- Devasthanam A. S. and Tomasi T. B.** (2014). "Dicer in immune cell development and function." *Immunol Invest* 43: 182-195.
- Diederichs S. and Haber D. A.** (2007). "Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression." *Cell* 131: 1097-1108.
- Drinneberg I. A., Weinberg D. E., Xie K. T., Mower J. P., Wolfe K. H., Fink G. R. and Bartel D. P.** (2009). "RNAi in budding yeast." *Science* 326: 544-550.
- Dynoodt P., Speckaert R., De Wever O., Chevolet I., Brochez L., Lambert J. and Van Gele M.** (2013). "miR-145 overexpression suppresses the migration and invasion of metastatic melanoma cells." *Int J Oncol* 42: 1443-1451.
- Elkayam E., Kuhn C. D., Tocilj A., Haase A. D., Greene E. M., Hannon G. J. and Joshua-Tor L.** (2012). "The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a." *Cell* 150: 100-110.
- Eulalio A., Behm-Ansmant I. and Izaurralde E.** (2007). "P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 9-22.
- Faehnle C. R., Elkayam E., Haase A. D., Hannon G. J. and Joshua-Tor L.** (2013). "The making of a slicer: activation of human Argonaute-1." *Cell Rep* 3: 1901-1909.
- Felicetti F., Errico M. C., Bottero L., Segnalini P., Stoppacciaro A., Biffoni M., Felli N., Mattia G., Petrini M., Colombo M. P., Peschle C. and Care A.** (2008). "The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms." *Cancer Res* 68: 2745-2754.
- Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J. W., Comber H., Forman D. and Bray F.** (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." *Eur J Cancer* 49: 1374-1403.
- Filipowicz W., Bhattacharyya S. N. and Sonenberg N.** (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* 9: 102-114.
- Finch M. L., Marquardt J. U., Yeoh G. C. and Callus B. A.** (2014). "Regulation of microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease." *Int J Biochem Cell Biol*.
- Finnegan E. F. and Pasquinelli A. E.** (2013). "MicroRNA biogenesis: regulating the regulators." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 48: 51-68.
- Frank F., Sonenberg N. and Nagar B.** (2010). "Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2." *Nature* 465: 818-822.
- Friedman R. C., Farh K. K., Burge C. B. and Bartel D. P.** (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* 19: 92-105.

- Fukuda T., Yamagata K., Fujiyama S., Matsumoto T., Koshida I., Yoshimura K., Mihara M., Naitou M., Endoh H., Nakamura T., Akimoto C., Yamamoto Y., Katagiri T., Foulds C., Takezawa S., Kitagawa H., Takeyama K., O'Malley B. W. and Kato S.** (2007). "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs." *Nat Cell Biol* 9: 604-611.
- Gandini S., Autier P. and Boniol M.** (2011). "Reviews on sun exposure and artificial light and melanoma." *Prog Biophys Mol Biol* 107: 362-366.
- Garbe C. and Leiter U.** (2009). "Melanoma epidemiology and trends." *Clin Dermatol* 27: 3-9.
- Garnett M. J. and Marais R.** (2004). "Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene." *Cancer Cell* 6: 313-319.
- Geng L., Sun B., Gao B., Wang Z., Quan C., Wei F. and Fang X. D.** (2014). "MicroRNA-103 Promotes Colorectal Cancer by Targeting Tumor Suppressor DICER and PTEN." *Int J Mol Sci* 15: 8458-8472.
- Geusens B., Sanders N., Prow T., Van Gele M. and Lambert J.** (2009). "Cutaneous short-interfering RNA therapy." *Expert Opin Drug Deliv* 6: 1333-1349.
- Glud M. and Gniadecki R.** (2013). "MicroRNAs in the pathogenesis of malignant melanoma." *J Eur Acad Dermatol Venereol* 27: 142-150.
- Greenberg E., Nemlich Y. and Markel G.** (2014). "MicroRNAs in Cancer: Lessons from Melanoma." *Curr Pharm Des.*
- Griffiths-Jones S., Saini H. K., van Dongen S. and Enright A. J.** (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." *Nucleic Acids Res* 36: D154-158.
- Gu W., Shirayama M., Conte D., Jr., Vasale J., Batista P. J., Claycomb J. M., Moresco J. J., Youngman E. M., Keys J., Stoltz M. J., Chen C. C., Chaves D. A., Duan S., Kasschau K. D., Fahlgren N., Yates J. R., 3rd, Mitani S., Carrington J. C. and Mello C. C.** (2009). "Distinct argonaute-mediated 22G-RNA pathways direct genome surveillance in the *C. elegans* germline." *Mol Cell* 36: 231-244.
- Guo L., Zhao Y., Yang S., Cai M., Wu Q. and Chen F.** (2013). "Genome-wide screen for aberrantly expressed miRNAs reveals miRNA profile signature in breast cancer." *Mol Biol Rep* 40: 2175-2186.
- Gurtan A. M. and Sharp P. A.** (2013). "The role of miRNAs in regulating gene expression networks." *J Mol Biol* 425: 3582-3600.
- Haflidadottir B. S., Bergsteinsdottir K., Praetorius C. and Steingrimsdottir E.** (2010). "miR-148 regulates Mitf in melanoma cells." *PLoS One* 5: e11574.
- Halaban R.** (2005). "Rb/E2F: a two-edged sword in the melanocytic system." *Cancer Metastasis Rev* 24: 339-356.
- Han J., Lee Y., Yeom K. H., Nam J. W., Heo I., Rhee J. K., Sohn S. Y., Cho Y., Zhang B. T. and Kim V. N.** (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." *Cell* 125: 887-901.
- Hanzelmann P., Schafer A., Voller D. and Schindelin H.** (2012). "Structural insights into functional modes of proteins involved in ubiquitin family pathways." *Methods Mol Biol* 832: 547-576.
- Hauptmann J., Dueck A., Harlander S., Pfaff J., Merkl R. and Meister G.** (2013). "Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes." *Nat Struct Mol Biol* 20: 814-817.
- Hauptmann J. and Meister G.** (2013). "Argonaute regulation: two roads to the same destination." *Dev Cell* 25: 553-554.
- Heinemann A., Zhao F., Pechlivanis S., Eberle J., Steinle A., Diederichs S., Schadendorf D. and Paschen A.** (2012). "Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D." *Cancer Res* 72: 460-471.

- Hoek K. S. and Goding C. R.** (2010). "Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma." *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 746-759.
- Hogan D. J., Vincent T. M., Fish S., Marcusson E. G., Bhat B., Chau B. N. and Zisoulis D. G.** (2014). "Anti-miRs Competitively Inhibit microRNAs in Argonaute Complexes." *PLoS One* 9: e100951.
- Igoucheva O. and Alexeev V.** (2009). "MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma." *Biochem Biophys Res Commun* 379: 790-794.
- Jackson R. J. and Standart N.** (2007). "How do microRNAs regulate gene expression?" *Sci STKE* 2007: re1.
- Jafarnejad S. M., Sjoestroem C., Martinka M. and Li G.** (2013). "Expression of the RNase III enzyme DROSHA is reduced during progression of human cutaneous melanoma." *Mod Pathol* 26: 902-910.
- Jakymiw A., Lian S., Eystathioy T., Li S., Satoh M., Hamel J. C., Fritzler M. J. and Chan E. K.** (2005). "Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference." *Nat Cell Biol* 7: 1267-1274.
- Jakymiw A., Pauley K. M., Li S., Ikeda K., Lian S., Eystathioy T., Satoh M., Fritzler M. J. and Chan E. K.** (2007). "The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing." *J Cell Sci* 120: 1317-1323.
- Johnson D.** (2014). "The ubiquitin-proteasome system: opportunities for therapeutic intervention in solid tumors." *Endocr Relat Cancer*.
- Kappellmann M., Bosserhoff A. and Kuphal S.** (2014). "AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma." *Eur J Cell Biol* 93: 76-81.
- Kappellmann M., Kuphal S., Meister G., Vardimon L. and Bosserhoff A. K.** (2013). "MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression." *Oncogene* 32: 2984-2991.
- Karreth F. A., Tay Y., Perna D., Ala U., Tan S. M., Rust A. G., DeNicola G., Webster K. A., Weiss D., Perez-Mancera P. A., Krauthammer M., Halaban R., Provero P., Adams D. J., Tuveson D. A. and Pandolfi P. P.** (2011). "In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma." *Cell* 147: 382-395.
- Kawamata T. and Tomari Y.** (2010). "Making RISC." *Trends Biochem Sci* 35: 368-376.
- Keller D. S., Thomay A. A., Gaughan J., Olszanski A., Wu H., Berger A. C. and Farma J. M.** (2013). "Outcomes in patients with mucosal melanomas." *J Surg Oncol* 108: 516-520.
- Khvorova A., Reynolds A. and Jayasena S. D.** (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell* 115: 209-216.
- Kim B., Lee J. H., Park J. W., Kwon T. K., Baek S. K., Hwang I. and Kim S.** (2013). "An essential microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 is up-regulated in colorectal carcinomas." *Clin Exp Med*.
- Kim B. S., Jung J. S., Jang J. H., Kang K. S. and Kang S. K.** (2011). "Nuclear Argonaute 2 regulates adipose tissue-derived stem cell survival through direct control of miR10b and selenoprotein N1 expression." *Aging Cell* 10: 277-291.
- Kim K. B., Eton O., Davis D. W., Frazier M. L., McConkey D. J., Diwan A. H., Papadopoulos N. E., Bedikian A. Y., Camacho L. H., Ross M. I., Cormier J. N., Gershenwald J. E., Lee J. E., Mansfield P. F., Billings L. A., Ng C. S., Charnsangavej C., Bar-Eli M., Johnson M. M., Murgo A. J. and Prieto V. G.** (2008). "Phase II trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma." *Br J Cancer* 99: 734-740.
- Kitago M., Martinez S. R., Nakamura T., Sim M. S. and Hoon D. S.** (2009). "Regulation of RUNX3 tumor suppressor gene expression in cutaneous melanoma." *Clin Cancer Res* 15: 2988-2994.
- Ko J. M. and Fisher D. E.** (2011). "A new era: melanoma genetics and therapeutics." *J Pathol* 223: 241-250.
- Krol J., Loedige I. and Filipowicz W.** (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." *Nat Rev Genet* 11: 597-610.
- Kumar C. C.** (2003). "Integrin alpha v beta 3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis." *Curr Drug Targets* 4: 123-131.

- Kundu S. T., Nallur S., Paranjape T., Boeke M., Weidhaas J. B. and Slack F. J.** (2012). "KRAS alleles: the LCS6 3'UTR variant and KRAS coding sequence mutations in the NCI-60 panel." *Cell Cycle* 11: 361-366.
- Kunz M.** (2013). "MicroRNAs in melanoma biology." *Adv Exp Med Biol* 774: 103-120.
- Kwak P. B. and Tomari Y.** (2012). "The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly." *Nat Struct Mol Biol* 19: 145-151.
- Kwong L., Chin L. and Wagner S. N.** (2007). "Growth factors and oncogenes as targets in melanoma: lost in translation?" *Adv Dermatol* 23: 99-129.
- La Porta C. A.** (2007). "Drug resistance in melanoma: new perspectives." *Curr Med Chem* 14: 387-391.
- Lasithiotakis K. G., Sinnberg T. W., Schitteck B., Flaherty K. T., Kulms D., Maczey E., Garbe C. and Meier F. E.** (2008). "Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells." *J Invest Dermatol* 128: 2013-2023.
- Lazzaretti D., Tournier I. and Izaurralde E.** (2009). "The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins." *RNA* 15: 1059-1066.
- Leung A. K. and Sharp P. A.** (2013). "Quantifying Argonaute proteins in and out of GW/P-bodies: implications in microRNA activities." *Adv Exp Med Biol* 768: 165-182.
- Leung A. K., Vyas S., Rood J. E., Bhutkar A., Sharp P. A. and Chang P.** (2011). "Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm." *Mol Cell* 42: 489-499.
- Leuschner P. J., Ameres S. L., Kueng S. and Martinez J.** (2006). "Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells." *EMBO Rep* 7: 314-320.
- Levati L., Pagani E., Romani S., Castiglia D., Piccinni E., Covaciu C., Caporaso P., Bondanza S., Antonetti F. R., Bonmassar E., Martelli F., Alvino E. and D'Atri S.** (2011). "MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines." *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 538-550.
- Levy C., Khaled M., Iliopoulos D., Janas M. M., Schubert S., Pinner S., Chen P. H., Li S., Fletcher A. L., Yokoyama S., Scott K. L., Garraway L. A., Song J. S., Granter S. R., Turley S. J., Fisher D. E. and Novina C. D.** (2010). "Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma." *Mol Cell* 40: 841-849.
- Lewis B. P., Burge C. B. and Bartel D. P.** (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell* 120: 15-20.
- Lin J. Y. and Fisher D. E.** (2007). "Melanocyte biology and skin pigmentation." *Nature* 445: 843-850.
- Lingel A., Simon B., Izaurralde E. and Sattler M.** (2003). "Structure and nucleic-acid binding of the Drosophila Argonaute 2 PAZ domain." *Nature* 426: 465-469.
- Liu J., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L. and Hannon G. J.** (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305: 1437-1441.
- Liu S., Kumar S. M., Lu H., Liu A., Yang R., Pushparajan A., Guo W. and Xu X.** (2012). "MicroRNA-9 up-regulates E-cadherin through inhibition of NF-kappaB1-Snail1 pathway in melanoma." *J Pathol* 226: 61-72.
- Lourenco S. V., Fernandes J. D., Hsieh R., Coutinho-Camillo C. M., Bologna S., Sanguenza M. and Nico M. M.** (2014). "Head and Neck Mucosal Melanoma: A Review." *Am J Dermatopathol*.
- Lu J., Getz G., Miska E. A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B. L., Mak R. H., Ferrando A. A., Downing J. R., Jacks T., Horvitz H. R. and Golub T. R.** (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." *Nature* 435: 834-838.
- Lund E. and Dahlberg J. E.** (2006). "Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 59-66.

- Luo C., Weber C. E., Osen W., Bosserhoff A. K. and Eichmüller S. B.** (2014). "The role of microRNAs in melanoma." *Eur J Cell Biol* 93: 11-22.
- Luteijn M. J. and Ketting R. F.** (2013). "PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics." *Nat Rev Genet* 14: 523-534.
- Ma J. B., Ye K. and Patel D. J.** (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." *Nature* 429: 318-322.
- Madeddu P.** (2005). "Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration." *Exp Physiol* 90: 315-326.
- Madison K. C.** (2003). "Barrier function of the skin: "la raison d'être" of the epidermis." *J Invest Dermatol* 121: 231-241.
- Mallory A. and Vaucheret H.** (2010). "Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins." *Plant Cell* 22: 3879-3889.
- Mallory A. C., Elmayan T. and Vaucheret H.** (2008). "MicroRNA maturation and action--the expanding roles of ARGONAUTES." *Curr Opin Plant Biol* 11: 560-566.
- Maqbool R. and Hussain M. U.** (2014). "MicroRNAs and human diseases: diagnostic and therapeutic potential." *Cell Tissue Res.*
- Margolin K., Longmate J., Baratta T., Synold T., Christensen S., Weber J., Gajewski T., Quirt I. and Doroshow J. H.** (2005). "CCI-779 in metastatic melanoma: a phase II trial of the California Cancer Consortium." *Cancer* 104: 1045-1048.
- Marin J. J., Bujanda L. and Banales J. M.** (2014). "MicroRNAs and cholestatic liver diseases." *Curr Opin Gastroenterol* 30: 303-309.
- Martinez J. and Tuschl T.** (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." *Genes Dev* 18: 975-980.
- Massoumi R., Kuphal S., Hellerbrand C., Haas B., Wild P., Spruss T., Pfeifer A., Fassler R. and Bosserhoff A. K.** (2009). "Down-regulation of CYLD expression by Snail promotes tumor progression in malignant melanoma." *J Exp Med* 206: 221-232.
- McPherson L. A., Loktev A. V. and Weigel R. J.** (2002). "Tumor suppressor activity of AP2alpha mediated through a direct interaction with p53." *J Biol Chem* 277: 45028-45033.
- Meister G.** (2013). "Argonaute proteins: functional insights and emerging roles." *Nat Rev Genet* 14: 447-459.
- Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G. and Tuschl T.** (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." *Mol Cell* 15: 185-197.
- Meister G., Landthaler M., Peters L., Chen P. Y., Urlaub H., Luhrmann R. and Tuschl T.** (2005). "Identification of novel argonaute-associated proteins." *Curr Biol* 15: 2149-2155.
- Melo S. A., Ropero S., Moutinho C., Aaltonen L. A., Yamamoto H., Calin G. A., Rossi S., Fernandez A. F., Carneiro F., Oliveira C., Ferreira B., Liu C. G., Villanueva A., Capella G., Schwartz S., Jr., Shiekhattar R. and Esteller M.** (2009). "A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function." *Nat Genet* 41: 365-370.
- Migliore C., Petrelli A., Ghiso E., Corso S., Capparuccia L., Eramo A., Comoglio P. M. and Giordano S.** (2008). "MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth." *Cancer Res* 68: 10128-10136.
- Miller A. J. and Mihm M. C., Jr.** (2006). "Melanoma." *N Engl J Med* 355: 51-65.
- Misra S.** (2013). "Human gene therapy: a brief overview of the genetic revolution." *J Assoc Physicians India* 61: 127-133.
- Miyoshi K., Tsukumo H., Nagami T., Siomi H. and Siomi M. C.** (2005). "Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation." *Genes Dev* 19: 2837-2848.
- Molhoek K. R., Brautigan D. L. and Slingluff C. L., Jr.** (2005). "Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor Rapamycin." *J Transl Med* 3: 39.
- Mueller D. W. and Bosserhoff A. K.** (2009). "Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma." *Br J Cancer* 101: 551-556.

- Mueller D. W. and Bosserhoff A. K.** (2011). "MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression." *Int J Cancer* 129: 1064-1074.
- Mueller D. W., Rehli M. and Bosserhoff A. K.** (2009). "miRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma." *J Invest Dermatol* 129: 1740-1751.
- Müller D. W.** (2009). "Bedeutung von miRNAs bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms." Dissertation Uni-Regensburg.
- Muller D. W. and Bosserhoff A. K.** (2008). "Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma." *Oncogene* 27: 6698-6706.
- Nakanishi K., Weinberg D. E., Bartel D. P. and Patel D. J.** (2012). "Structure of yeast Argonaute with guide RNA." *Nature* 486: 368-374.
- Nazarov P. V., Reinsbach S. E., Muller A., Nicot N., Philippidou D., Vallar L. and Kreis S.** (2013). "Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function." *Nucleic Acids Res* 41: 2817-2831.
- Nishi K., Nishi A., Nagasawa T. and Ui-Tei K.** (2013). "Human TNRC6A is an Argonaute-navigator protein for microRNA-mediated gene silencing in the nucleus." *RNA* 19: 17-35.
- Noguchi S., Mori T., Otsuka Y., Yamada N., Yasui Y., Iwasaki J., Kumazaki M., Maruo K. and Akao Y.** (2012). "Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells." *J Biol Chem* 287: 11769-11777.
- Nowotny M., Gaidamakov S. A., Crouch R. J. and Yang W.** (2005). "Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: substrate specificity and metal-dependent catalysis." *Cell* 121: 1005-1016.
- Panizzon R. G. and Guggisberg D.** (1999). "[Clinical aspects and pathology of melanoma]." *Ther Umsch* 56: 302-308.
- Penna E., Orso F., Cimino D., Tenaglia E., Lembo A., Quagliano E., Polisenio L., Haimovic A., Osella-Abate S., De Pitta C., Pinatel E., Stadler M. B., Provero P., Bernengo M. G., Osman I. and Taverna D.** (2011). "microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C." *EMBO J* 30: 1990-2007.
- Pfaff J., Hennig J., Herzog F., Aebersold R., Sattler M., Niessing D. and Meister G.** (2013). "Structural features of Argonaute-GW182 protein interactions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E3770-3779.
- Pfaff J. and Meister G.** (2013). "Argonaute and GW182 proteins: an effective alliance in gene silencing." *Biochem Soc Trans* 41: 855-860.
- Philippidou D., Schmitt M., Moser D., Margue C., Nazarov P. V., Muller A., Vallar L., Nashan D., Behrmann I. and Kreis S.** (2010). "Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma." *Cancer Res* 70: 4163-4173.
- Plettenberg A., Ballaun C., Pammer J., Mildner M., Strunk D., Weninger W. and Tschachler E.** (1995). "Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture." *Am J Pathol* 146: 651-659.
- Plonka P. M., Passeron T., Brenner M., Tobin D. J., Shibahara S., Thomas A., Slominski A., Kadekaro A. L., Herschkovitz D., Peters E., Nordlund J. J., Abdel-Malek Z., Takeda K., Paus R., Ortonne J. P., Hearing V. J. and Schallreuter K. U.** (2009). "What are melanocytes really doing all day long...?" *Exp Dermatol* 18: 799-819.
- Poser I., Dominguez D., de Herreros A. G., Varnai A., Buettner R. and Bosserhoff A. K.** (2001). "Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail." *J Biol Chem* 276: 24661-24666.
- Proksch E., Brandner J. M. and Jensen J. M.** (2008). "The skin: an indispensable barrier." *Exp Dermatol* 17: 1063-1072.
- Qi H. H., Ongusaha P. P., Myllyharju J., Cheng D., Pakkanen O., Shi Y., Lee S. W. and Peng J.** (2008). "Prolyl 4-hydroxylation regulates Argonaute 2 stability." *Nature* 455: 421-424.

- Quevedo W. C., Szabo G. and Virks J.** (1969). "Influence of age and UV on the populations of dopa-positive melanocytes in human skin." *J Invest Dermatol* 52: 287-290.
- Rand T. A., Petersen S., Du F. and Wang X.** (2005). "Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation." *Cell* 123: 621-629.
- Rastrelli M., Alaibac M., Stramare R., Chiarion Sileni V., Montesco M. C., Vecchiato A., Campana L. G. and Rossi C. R.** (2013). "Melanoma m (zero): diagnosis and therapy." *ISRN Dermatol* 2013: 616170.
- Rockmann H. and Schadendorf D.** (2003). "Drug resistance in human melanoma: mechanisms and therapeutic opportunities." *Onkologie* 26: 581-587.
- Ross R. J., Weiner M. M. and Lin H.** (2014). "PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma." *Nature* 505: 353-359.
- Rudel S., Flatley A., Weinmann L., Kremmer E. and Meister G.** (2008). "A multifunctional human Argonaute2-specific monoclonal antibody." *RNA* 14: 1244-1253.
- Rudel S. and Meister G.** (2008). "Phosphorylation of Argonaute proteins: regulating gene regulators." *Biochem J* 413: e7-9.
- Rybak A., Fuchs H., Hadian K., Smirnova L., Wulczyn E. A., Michel G., Nitsch R., Krappmann D. and Wulczyn F. G.** (2009). "The let-7 target gene mouse lin-41 is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2." *Nat Cell Biol* 11: 1411-1420.
- Saini H. K., Griffiths-Jones S. and Enright A. J.** (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17719-17724.
- Sand M., Skrygan M., Georgas D., Arenz C., Gambichler T., Sand D., Altmeyer P. and Bechara F. G.** (2012). "Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components argonaute-1, argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer." *Mol Carcinog* 51: 916-922.
- Sand M., Skrygan M., Georgas D., Sand D., Gambichler T., Altmeyer P. and Bechara F. G.** (2012). "The miRNA machinery in primary cutaneous malignant melanoma, cutaneous malignant melanoma metastases and benign melanocytic nevi." *Cell Tissue Res* 350: 119-126.
- Sasaki T., Shiohama A., Minoshima S. and Shimizu N.** (2003). "Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome." *Genomics* 82: 323-330.
- Schiffner S.** (2012). "Molekulare Analyse von Modulatoren der Melanomentstehung und progression anhand eines murinen Modellsystems." *Dissertation Uni-Regensburg*.
- Schirle N. T. and MacRae I. J.** (2012). "The crystal structure of human Argonaute2." *Science* 336: 1037-1040.
- Schlessinger J.** (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." *Cell* 103: 211-225.
- Schultz J., Lorenz P., Gross G., Ibrahim S. and Kunz M.** (2008). "MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth." *Cell Res* 18: 549-557.
- Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N. and Zamore P. D.** (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell* 115: 199-208.
- Schwarz D. S., Tomari Y. and Zamore P. D.** (2004). "The RNA-induced silencing complex is a Mg²⁺-dependent endonuclease." *Curr Biol* 14: 787-791.
- Seftor R. E.** (1998). "Role of the beta3 integrin subunit in human primary melanoma progression: multifunctional activities associated with alpha(v)beta3 integrin expression." *Am J Pathol* 153: 1347-1351.
- Segura M. F., Hanniford D., Menendez S., Reavie L., Zou X., Alvarez-Diaz S., Zakrzewski J., Blochin E., Rose A., Bogunovic D., Polsky D., Wei J., Lee P., Belitskaya-Levy I., Bhardwaj N., Osman I. and Hernando E.** (2009). "Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1814-1819.

- Serpico D., Molino L. and Di Cosimo S.** (2013). "microRNAs in breast cancer development and treatment." *Cancer Treat Rev*.
- Serpico D., Molino L. and Di Cosimo S.** (2014). "microRNAs in breast cancer development and treatment." *Cancer Treat Rev* 40: 595-604.
- Shahshahan M. A., Beckley M. N. and Jazirehi A. R.** (2011). "Potential usage of proteasome inhibitor bortezomib (Velcade, PS-341) in the treatment of metastatic melanoma: basic and clinical aspects." *Am J Cancer Res* 1: 913-924.
- Sheppard K. E. and McArthur G. A.** (2013). "The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma." *Clin Cancer Res* 19: 5320-5328.
- Shtivelman E., Davies M. Q., Hwu P., Yang J., Lotem M., Oren M., Flaherty K. T. and Fisher D. E.** (2014). "Pathways and therapeutic targets in melanoma." *Oncotarget* V5: 1701-1752.
- Slominski A., Tobin D. J., Shibahara S. and Wortsman J.** (2004). "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation." *Physiol Rev* 84: 1155-1228.
- Soares M. R., Huber J., Rios A. F. and Ramos E. S.** (2010). "Investigation of IGF2/Apa1 and H19/Rsa1 polymorphisms in patients with cutaneous melanoma." *Growth Horm IGF Res* 20: 295-297.
- Sparrow L. E. and Heenan P. J.** (1999). "Differential expression of epidermal growth factor receptor in melanocytic tumours demonstrated by immunohistochemistry and mRNA in situ hybridization." *Australas J Dermatol* 40: 19-24.
- Stahl J. M., Sharma A., Cheung M., Zimmerman M., Cheng J. Q., Bosenberg M. W., Kester M., Sandirasegarane L. and Robertson G. P.** (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." *Cancer Res* 64: 7002-7010.
- Sugumaran M.** (1991). "Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis. Comparison with insect cuticular sclerotization." *FEBS Lett* 295: 233-239.
- Swoboda A., Schanab O., Tauber S., Bilban M., Berger W., Petzelbauer P. and Mikula M.** (2012). "MET expression in melanoma correlates with a lymphangiogenic phenotype." *Hum Mol Genet* 21: 3387-3396.
- Tannous Z. S., Mihm M. C., Jr., Sober A. J. and Duncan L. M.** (2005). "Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management." *J Am Acad Dermatol* 52: 197-203.
- Tokarz P. and Blasiak J.** (2012). "The role of microRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment." *Acta Biochim Pol* 59: 467-474.
- Tolia N. H. and Joshua-Tor L.** (2007). "Slicer and the argonautes." *Nat Chem Biol* 3: 36-43.
- Tsao H., Zhang X., Benoit E. and Haluska F. G.** (1998). "Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines." *Oncogene* 16: 3397-3402.
- Ulfing N.** (2003). *Kurzlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag.
- Valdmanis P. N., Gu S., Schuermann N., Sethupathy P., Grimm D. and Kay M. A.** (2012). "Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene silencing." *Nucleic Acids Res* 40: 3704-3713.
- Videira I. F., Moura D. F. and Magina S.** (2013). "Mechanisms regulating melanogenesis." *An Bras Dermatol* 88: 76-83.
- Visani M., de Biase D., Marucci G., Cerasoli S., Nigrisoli E., Bacchi Reggiani M. L., Albani F., Baruzzi A. and Pession A.** (2014). "Expression of 19 microRNAs in glioblastoma and comparison with other brain neoplasia of grades I-III." *Mol Oncol* 8: 417-430.
- Völler D., Ott C. and Bosserhoff A.** (2013). "MicroRNAs in malignant melanoma." *Clin Biochem* 46: 909-917.
- Völler D., Reinders J., Meister G. and Bosserhoff A. K.** (2013). "Strong reduction of AGO2 expression in melanoma and cellular consequences." *Br J Cancer* 109: 3116-3124.
- Wang D., Zhang Z., O'Loughlin E., Lee T., Houel S., O'Carroll D., Tarakhovsky A., Ahn N. G. and Yi R.** (2012). "Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development." *Genes Dev* 26: 693-704.

- Wang M., Ren D., Guo W., Wang Z., Huang S., Du H., Song L. and Peng X.** (2014). "Loss of miR-100 enhances migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and stemness properties in prostate cancer cells through targeting Argonaute 2." *Int J Oncol* 45: 362-372.
- Wang W., Zhao L. J., Tan Y. X., Ren H. and Qi Z. T.** (2012). "Identification of deregulated miRNAs and their targets in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma." *World J Gastroenterol* 18: 5442-5453.
- Watanabe T., Totoki Y., Toyoda A., Kaneda M., Kuramochi-Miyagawa S., Obata Y., Chiba H., Kohara Y., Kono T., Nakano T., Surani M. A., Sakaki Y. and Sasaki H.** (2008). "Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes." *Nature* 453: 539-543.
- Weide B., Elsasser M., Buttner P., Pflugfelder A., Leiter U., Eigentler T. K., Bauer J., Witte M., Meier F. and Garbe C.** (2012). "Serum markers lactate dehydrogenase and S100B predict independently disease outcome in melanoma patients with distant metastasis." *Br J Cancer* 107: 422-428.
- Wilson R. C. and Doudna J. A.** (2013). "Molecular mechanisms of RNA interference." *Annu Rev Biophys* 42: 217-239.
- Winter J. and Diederichs S.** (2013). "Argonaute-3 activates the let-7a passenger strand microRNA." *RNA Biol* 10: 1631-1643.
- Wu S., Yu W., Qu X., Wang R., Xu J., Zhang Q., Li J. and Chen L.** (2014). "Argonaute 2 promotes myeloma angiogenesis via microRNA dysregulation." *J Hematol Oncol* 7: 40.
- Yanaihara N., Caplen N., Bowman E., Seike M., Kumamoto K., Yi M., Stephens R. M., Okamoto A., Yokota J., Tanaka T., Calin G. A., Liu C. G., Croce C. M. and Harris C. C.** (2006). "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis." *Cancer Cell* 9: 189-198.
- Yang Z., Jakymiw A., Wood M. R., Eystathiou T., Rubin R. L., Fritzler M. J. and Chan E. K.** (2004). "GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation." *J Cell Sci* 117: 5567-5578.
- Ye X., Huang N., Liu Y., Paroo Z., Huerta C., Li P., Chen S., Liu Q. and Zhang H.** (2011). "Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation." *Nat Struct Mol Biol* 18: 650-657.
- Yeramian A., Sorolla A., Velasco A., Santacana M., Dolcet X., Valls J., Abal L., Moreno S., Egido R., Casanova J. M., Puig S., Vilella R., Llombart-Cussac A., Matias-Guiu X. and Marti R. M.** (2012). "Inhibition of activated receptor tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway." *Int J Cancer* 130: 967-978.
- Yoda M., Kawamata T., Paroo Z., Ye X., Iwasaki S., Liu Q. and Tomari Y.** (2010). "ATP-dependent human RISC assembly pathways." *Nat Struct Mol Biol* 17: 17-23.
- Yuan L., Chu H., Wang M., Gu X., Shi D., Ma L., Zhong D., Du M., Li P., Tong N., Fu G., Qin C., Yin C. and Zhang Z.** (2013). "Genetic variation in DROSHA 3'UTR regulated by hsa-miR-27b is associated with bladder cancer risk." *PLoS One* 8: e81524.
- Zagryazhskaya A. and Zhivotovsky B.** (2014). "miRNAs in lung cancer: A link to aging." *Ageing Res Rev.*
- Zeng Y., Sankala H., Zhang X. and Graves P. R.** (2008). "Phosphorylation of Argonaute 2 at serine-387 facilitates its localization to processing bodies." *Biochem J* 413: 429-436.
- Zhang J., Jin H., Liu H., Lv S., Wang B., Wang R., Ding M., Yang Y., Li L., Fu S., Xie D., Wu M., Zhou W. and Qian Q.** (2014). "MiRNA-99a directly regulates AGO2 through translational repression in hepatocellular carcinoma." *Oncogenesis* 3: e97.
- Zhang J., Zhang X. H., Wang C. X., Liu B., Fan X. S., Wen J. J., Shi Q. L. and Zhou X. J.** (2014). "Dysregulation of MicroRNA biosynthesis enzyme Dicer plays an important role in gastric cancer progression." *Int J Clin Exp Pathol* 7: 1702-1707.
- Zhang W., Liu J. and Wang G.** (2014). "The role of microRNAs in human breast cancer progression." *Tumour Biol.*

- Zhang Z., Chen G., Cheng Y., Martinka M. and Li G.** (2011). "Prognostic significance of RUNX3 expression in human melanoma." *Cancer* 117: 2719-2727.
- Zhao L., Sun Y., Hou Y., Peng Q., Wang L., Luo H., Tang X., Zeng Z. and Liu M.** (2012). "MiRNA expression analysis of cancer-associated fibroblasts and normal fibroblasts in breast cancer." *Int J Biochem Cell Biol* 44: 2051-2059.
- Zheng D., Chen C. Y. and Shyu A. B.** (2011). "Unraveling regulation and new components of human P-bodies through a protein interaction framework and experimental validation." *RNA* 17: 1619-1634.
- Zhou L., Hou J., Fu W., Wang D., Yuan Z. and Jiang H.** (2008). "Arsenic trioxide and 2-methoxyestradiol reduce beta-catenin accumulation after proteasome inhibition and enhance the sensitivity of myeloma cells to Bortezomib." *Leuk Res* 32: 1674-1683.
- Zimmermann T. S., Lee A. C., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M. N., Harborth J., Heyes J. A., Jeffs L. B., John M., Judge A. D., Lam K., McClintock K., Nechev L. V., Palmer L. R., Racie T., Rohl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A. J., Yaworski E., Zedalis W., Koteliansky V., Manoharan M., Vornlocher H. P. and MacLachlan I.** (2006). "RNAi-mediated gene silencing in non-human primates." *Nature* 441: 111-114.
- Zipprich J. T., Bhattacharyya S., Mathys H. and Filipowicz W.** (2009). "Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression." *RNA* 15: 781-793.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Daniel Völler, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Ursprungs sind, in jedem Einzelfall mit Angabe des Urhebers als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren versichere ich, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat sowie, dass ich mich noch nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe bzw. einen solchen bereits besitze.

Regensburg, 11.02.2015

.....
(Ort, Datum)

D. Völler

.....
(Unterschrift)

DANKSAGUNG

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. Anja-Katrin Boßerhoff für die Überlassung des sehr interessanten und spannenden Dissertationsthemas. Ebenfalls vielen Dank für die engagierte Betreuung und die fortwährende Unterstützung in allen Bereichen der Wissenschaftsarbeit, von der alltäglichen Laborarbeit bis hin zum Publizieren von Fachartikeln.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Gunter Meister für die Übernahme der Mentorenschaft und die Erstellung des Zweitgutachtens ebenso wie für die sehr produktiven Diskussionen während der regelmäßigen Treffen bedanken.

Dem Institutsleiter der Pathologie, Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter danke ich für die Möglichkeit diese Dissertation an seinem Institut anfertigen zu können.

Ich danke umfassend allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der molekularen Pathologie für das gute Arbeitsklima, die Hilfe und Unterstützung. Ein besonderer Dank geht dabei an meine Laborkollegin Sibylla Lodermeier, die immer für mich da war und mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Dr. Alexander Riechers möchte ich sehr herzlich danken für das kritische Korrekturlesen der Arbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Vielen Dank auch an PD Dr. Jörg Reinders, Dr. Yvonne Reinders und Dr. Astrid Bruckmann für die massenspektrometrischen Untersuchungen und die hilfreiche Unterstützung.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner ganzen Familie bedanken. Besonders bei meinen Eltern Kornelia und Stephan, die mein Studium und meine Promotion sowohl finanziell als auch moralisch unterstützt haben und mir dies ermöglicht haben.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Freundin Mary ganz herzlich bedanken. Nicht nur für das Korrekturlesen dieser Arbeit, sondern vor allem für die Unterstützung, Hilfe, Ermutigungen und Geduld.